



# Identification d'une nouvelle voie de signalisation impliquée dans la régulation des gènes par les acides aminés, chez les mammifères

Cédric Chaveroux

## ► To cite this version:

Cédric Chaveroux. Identification d'une nouvelle voie de signalisation impliquée dans la régulation des gènes par les acides aminés, chez les mammifères. Alimentation et Nutrition. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I; Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2009. Français. NNT : 2009CLF1MM21 . tel-00726314

**HAL Id: tel-00726314**

**<https://theses.hal.science/tel-00726314>**

Submitted on 29 Aug 2012

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

*Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé*

N° d'ordre :

*Thèse*

Présentée à l'Université d'Auvergne  
pour l'obtention du grade de Docteur d'Université

Spécialité : **Nutrition** (Biologie Moléculaire et Cellulaire)

Soutenue le 14 Décembre 2009

Cédric CHAVEROUX

---

**Identification d'une nouvelle voie de signalisation  
impliquée dans la régulation des gènes par les acides  
aminés, chez les mammifères**

---

Président : Pr. Jean-Marc LOBACCARO

Rapporteurs : Dr. Fabienne FOUFELLE  
Dr. Eric CHEVET

Examineurs : Dr. Benoît DERIJARD  
Pr. Vincent SAPIN

Directeur de thèse : Dr. Pierre FAFOURNOUX

# **REMERCIEMENTS**

J'exprime de sincères remerciements:

Au Professeur Jean-Marc Lobaccaro, du laboratoire de *Génétique, Développement et Reproduction*, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse. Au-delà de cette tâche, je le remercie aussi de m'avoir toujours soutenu au cours de mes études.

Au Docteur Fabienne Foufelle, du laboratoire *Pathologies nutritionnelles et métaboliques : obésité et diabète*, UMRS872, Centre de recherches des Cordeliers, Paris, d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse.

Au Docteur Eric Chevet, du laboratoire *Fibrose hépatique et cancer du foie*, Unité INSERM U889, Faculté de Médecine Lyon sud, Bordeaux, d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse.

Au Docteur Benoit Derijard, du laboratoire *Signalisation et différenciation musculaire*, UMR6548, Nice, d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse.

Au Professeur Vincent Sapin, du laboratoire *Implications métaboliques et moléculaires des rétinoïdes au cours du développement humain*, UMR6247/UMR931/Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand, d'avoir également accepté de faire partie de ce jury de thèse.

Je remercie également:

Mes anciens chefs : Françoise Degoul et Jean-Marc Lobaccaro pour avoir accepté de faire parti du jury de mon comité de thèse. Un merci spécial pour Jean-Marc pour m'avoir soutenu dans mes recherches de post-docs.

Yves Boirie et Jean-Michel Chardigny pour m'avoir accueilli en thèse au sein de l'Unité de Nutrition Humaine de l'INRA de Theix.

Toute l'équipe d'intervention rapide du GIGN (Groupe Interactions Gènes-Nutriments), pour m'avoir accepté au sein de l'équipe. Notamment les chefs : Celine, Alain, Cathy et Julien mais également mon Lolo national et Val qui auront eu le courage de me supporter pendant ces 3 (longues...) années.

Merci à tous les membres de l'unité, notamment les gens du côté obscur de la force (équipe protéolyse), dont les deux Daniel(s), Taillandier, et Béchet. Merci aussi aux deux Didier, Attaix et Delalande. Merci à M.P pour ces longues discussions et re-bonne retraite. Je remercierai ensuite tout particulièrement tous les membres de l'équipe Gènes et Nutriments, présents ou passés. Audrey, Alain O., Guillaume et Jérémie qui ne sont plus parmi nous aujourd'hui mais dont l'empreinte ne risque pas de s'en aller. Merci également à Christiane pour toujours avoir été là quand j'avais des petits soucis

techniques; à Yoyo, mon ancien compagnon de tranchées, parti au front japonais. Que la Force soit avec toi ...et un peu avec moi!!!

Egalement, un remerciement aux familles « GCN2+/+ » et « GCN2-/- » pour leurs apports lors de cette thèse. Je sais qu'elles auront beaucoup souffert durant ces 3 ans, mais les pertes n'auront pas été vaines.

Enfin, un grand merci à Henrietta Lacks, à ACER, aux ciseaux Olfa, le magazine l'Equipe, aux pneus Michelin, aux Musclés et aux usines M&M's, Coca Cola, Perrier et Bacardi.

Et surtout, je tiens à remercier tout particulièrement mon maître Yoda personnel : Pierre Fafournoux. Il a eu le courage et la force de m'encadrer durant ces 3 dernières années sans sombrer dans la dépression. Même si nos points de vue métaphysiques sur la différence entre l'optimisme et la lucidité concernant un résultat furent souvent divergents, il n'en reste pas moins que ces 3 dernières années furent aussi enrichissantes humainement que scientifiquement. Pour tout cela, je lui en suis énormément reconnaissant.

Merci à tous ces gens de m'avoir supporté pendant ces 3 dernières années. Trois ans, ça peut paraître long, mais dans une équipe comme celle là, on ne voit pas le temps passer...sauf quand la discussion parle de couches, bébés et autres nounous !!!

Merci à tous les enseignants qui m'ont donné le goût de l'enseignement lors de mon monitorat, à savoir : Anne Fogli, Emilie Brasset, Loïc Blanchon, Vincent Sapin, et bien sur ma tutrice Isabelle Creveaux

Merci à tous mes professeurs universitaires bien sûr, mais aussi à ceux du lycée, collègue...qui m'ont donné l'envie de travailler dans le domaine de la biologie.

Cette thèse est l'aboutissement de ces 8 dernières années passées à Clermont, et durant cette période j'ai découvert des gens merveilleux, qui sont devenus mes amis. Je ne pourrais les citer tous, mais sans eux, tout aurait été plus difficile.

Merci à tous mes amis de l'IUT, ces « vieux grognards des études », à savoir Jérôme dit Mich, JB dit JB, Fabien dit Fab dit Mamours, Amélie dit Am, Vanessa dit Vané dit Monique, Mathilde dont le surnom est encore à définir, Pierre-Antoine dit PAM, Caroline dit Caro, Nicolas dit Monjojo, Nathalie dit Nath, Franck dit Francky ou Bertrand dit Bébert.

Merci à Anthony, Gillou, Milou, les Alexandre, les Virginie, Nicolas, Suzy, les Lionel et mon vieux pote du lycée Yann, Dilek, Audrey, Hugues, Solange, Aurélie, Lucy, Kevin, Sylvie, la « Polono connection » et j'en oublie bien sur....en espérant qu'il ne se vexeront pas.

Pour finir, un grand merci à tous les membres de ma famille, frère, cousins, oncles, tantes, grands parents, et bien sûr en premier lieu mes parents et Alexia qui a du subir ces derniers mois de stress, et enfin Ronron pour qui mes répétitions en anglais ont laissé des séquelles.

# **ABBREVIATIONS**

4EBP1 : eIF4E-Binding Protein 1  
5-oxo-ETE : 5-oxo-(6E,8Z,11Z,14Z)-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid  
 $\alpha$ -IPM:  $\alpha$ -IsoPropyl Malate  
 $\mu$ M: micro Molaire  
AA: Acide Aminé  
AAP : Amino-Acid Permease  
AARE: Amino Acid Response Element  
ADN: Acide DésoxyriboNucléique  
ADNc: ADN complémentaire  
ADP: Adénosine DiPhosphate  
Ago: Argonaute  
AP-1 : Activator Protein-1  
APC: Cortex Piriforme Antérieur  
ARE: AU-Rich Element  
ARN: Acide RiboNucléique  
ARNm: ARN messenger  
ARNt: ARN de transfert  
ARNti : ARN de transfert initiateur  
ASK1: Apoptosis Signal-regulating Kinase  
ASNS: Asparagine Synthase  
ATF: Activating Transcription Factor  
ATP: Adénosine TriPhosphate  
BIP: Immunoglobulin-Binding Protein  
BMK1 : Big MAPK 1  
CAT-1: Cationic Amino acids Transporter 1  
Cdc42: Cell Division Cycle 42  
C/EBP: CCAAT/Enhancer Binding Protein  
CBP: domaine de liaison à la calmoduline  
GDH : Glutamate Déshydrogénase  
GDP: Guanosine Diphosphate  
ChIP: Chromatin ImmunoPrecipitation  
CHOP: C/EBP HOmologous Protein  
GMCG: cyclin-dependent kinases (CDKs), mitogen-activated protein kinases (MAPKs), glycogen synthase kinases (GSKs), and CDK-like kinases (CLKs)  
CoA : Coenzyme A  
CRE: Cyclic AMP Response Elements  
CREB: cAMP Responsive Element Binding protein  
DBD: DNA-Binding Domain  
DTT: dithiothreitol  
eEF: eukaryotic Elongation Factor  
EGF : Epidermal Growth Factor  
eIF2: eukaryotic Initiation Factor 2  
EPAC: Exchange Protein directly Activated by cAMP  
ER: Endoplasmic Reticulum  
ERK: Extracellular signal-Regulated Kinase  
ERSE: Endoplasmic Reticulum Stress Element

FAK : Focal Adhesion Kinase  
 FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfert  
 GABA: Acide  $\gamma$ -aminobutyrique  
 GADD153: Growth Arrest- and DNA Damage-inducible gene 153  
 GCN2: General Control of Nitrogen metabolism kinase 2  
 GCN4: General Control Nondepressible 4  
 GDH: Glutamate Deshydrogenase  
 GDP: Guanidine DiPhosphate  
 GEF: Guanine Exchange Factor  
 GLUT: Glucose transporter  
 Glut : Glutamine  
 GST: Glutathione S-Transferase  
 GTP: Guanidine TriPhosphate  
 H1/2A/2B/3/4 : Histone 1/2A/2B/3/4  
 HAT: Histone Acetyl-Transférase  
 HDAC: Histones DéACétylases  
 HGF: Hepathocyte Growth Factor  
 HIPK: Homeodomain-Interacting Protein Kinase  
 HMG: High-Mobility Group  
 HMT: Histone Métyl-Transferase  
 HRI: Heme-Regulated eIF2 $\alpha$  kinase  
 IGF: Insulin-like Growth Factor  
 IGFBP-1: Insulin-like Growth Factor Binding Protein 1  
 IL-1/6: Interleukin-1/6  
 IRAK : IL-1 Receptor-Associated Kinase  
 IRE: Iron Response Element  
 IRES: Internal Ribosome Entry Site  
 ITAF: IRES TransActing Factors  
 IPM : Isopropylmalate  
 JDP2: Jun Dimerization Protein 2  
 JIP: JNK Interacting-Protein  
 JLP: JIP Like Protein  
 JNK: c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal Kinase  
 JSAP: JNK/SAPK-Associated Protein 1  
 Kb: kilobase  
 kDa: kiloDalton  
 KIM : Kinase Interacting Domain  
 KO: Knock Out  
 KSR: Kinase Suppressor of Ras  
 LARG: Leukemia-Associated Rho Guanine nucleotide exchange factor  
 Leu: Leucine  
 Lys: Lysine  
 MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase  
 MAP2K: Mitogen Activated Protein Kinase Kinase  
 MAP3K: Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase  
 MAPKAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase-Activated Protein Kinase.  
 MEF: Mouse Embryonic Fibroblast  
 MEF2A/C: Myocyte Enhancer Factor 2A/C  
 MEK: MAPK/ERK Kinase  
 Met: Méthionine

mGCN2: mammalian General Control of Nitrogen metabolism kinase 2  
 miRNA: microRNA  
 MK5 : MAPK activated protein Kinase 5  
 MKP : MAPK Phosphatase  
 MLK : Mixed Lineage Kinase  
 MMS: Métyl Méthane Sulfonate  
 MNK : MAP kinase-interacting kinase 1  
 mTOR: mammalian Target Of Rapamycin  
 NFAT: Nuclear Factor of Activated T-cells  
 NF $\kappa$ B: Nuclear Factor- $\kappa$ B  
 NO $^{\circ}$ : monoxide d'azote radicalaire  
 NS-ARE: Nutrient Sensor AU-Rich Element  
 NSRE: Nutrient Sensing Response Elements  
 NSRU: Nutrient Sensing Response Unit  
 NLK : Nemo-Like Kinase  
 NLS : Nuclear Localization Signal  
 pb: paire de bases  
 OMS : Organisation Mondiale de la Santé  
 OSM : Osmosensing Scaffold for MEKK3  
 PABP: PolyA Binding Proteins  
 PCAF: P300/CBP Associated Factor  
 PCR: Polymerase Chain Reaction  
 PDK1 : Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1  
 PERK: Pancreatic Endoplasmic Reticulum eIF2 Kinase  
 PI3K : Phosphatidyl-Inositol 3'-Kinase  
 PIC: Complexe de Pré-Initiation  
 PKR: Protein kinase RNA-activated  
 PP2A : Protein Phosphatase 2A  
 PPAR : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  
 PRAK : p38-Regulated/Activated Kinase  
 Pro: Proline  
 PTP: Protein Tyrosin Phosphatase  
 PTR3 : Peptide Transport Protein 3  
 PDZ Domain : post synaptic density protein (Psd95), Drosophila disc large tumor suppressor (DlgA), and zonula occludens-1 protein (Zo-1) Domain  
 Rac1 : Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1  
 RANKL : Receptor Activator for Nuclear Factor  $\kappa$  B Ligand  
 RCPG : Récepteur Couplé aux protéines G  
 RISC : RNA Induce Silencing Complex  
 SAPK : Stress Activated Protein Kinase  
 SeCIS : Selenocystein Insertion Sequence  
 siRNA: small interference RiboNucleic Acid  
 SNAT2: Sodium-coupled Neutral Tmino acid Transporter 2  
 SSD: Signal Sensing Domain  
 SPS : Ssy1p, Ptr3p, Ssy5p  
 TAD : Trans-Activating Domain  
 TAFs: TATA Binding Protein-Associated Factors  
 TAK1 : TGF $\beta$  Activated Kinase 1  
 TAP: Tandem Affinity Purification  
 TAO : Thousand and one amino acid protein

TGF : Transforming Growth Factor  
Thr : Thréonine  
TK: Thymidine Kinase  
TNF : Tumor Necrosis Factor  
TPA : Tetradecanoylphorbol  
TOR: Target Of Rapamycin  
TORC : TOR Complex  
TRADD: TNF-R1-Associated Death Domain  
TRAIL : Tumor Necrosis factor-related Apoptosis-Inducing Ligand  
TRAF : TNF Receptor-Associated Factors  
TRB3: Tribble 3  
Tyr : Tyrosine  
uORF: upstream Open Reading Frame  
UPR: Unfolded Protein Response  
UTR: Untranslated Region  
UV: Ultra Violet  
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor  
Yck : Yeast casein kinase



# LISTE DES PUBLICATIONS

## Publication présentée en partie Résultats :

Identification of a novel amino acid response pathway triggering ATF2 phosphorylation in mammals.

**Chaveroux C.**, Jousse C., Cherasse Y., Maurin A.C., Parry L., Carraro V., Derijard B., Bruhat A., Fafournoux P.

*Mol. Cell. Biol.* 2009 Oct 12. [Epub ahead of print]

## Publications présentées en Annexes :

### Articles scientifiques :

Amino acid limitation regulates the expression of genes involved in several specific biological processes through GCN2-dependent and GCN2-independent pathways.

Deval C, **Chaveroux C**, Maurin AC, Cherasse Y, Parry L, Carraro V, Milenkovic D, Ferrara M, Bruhat A, Jousse C, Fafournoux P.

*FEBS J.* 2009 Feb;276(3):707-18. Epub 2008 Dec 19.

Amino-acid limitation induces the GCN2 signaling pathway in myoblasts but not in myotubes.

Deval C, Talvas J, **Chaveroux C**, Maurin AC, Mordier S, Cherasse Y, Parry L, Carraro V, Jousse C, Bruhat A, Fafournoux P.

*Biochimie.* 2008 Nov-Dec;90(11-12):1716-21. Epub 2008 Jul 25.

Role of the repressor JDP2 in the amino acid-regulated transcription of *CHOP*.

Chérasse Y, Maurin AC, **Chaveroux C**, Jousse C, Carraro V, Parry L, Fafournoux P and Bruhat A.

*FEBS Lett.* 2008 Apr 30;582(10):1537-41

The P300/CBP Associated Factor (PCAF) is a co-factor of ATF4 for amino acid-regulated transcription of *CHOP*.

Chérasse Y, Carraro V, Parry L, Maurin AC, Jousse C, **Chaveroux C**, Deval C, Chambon C, Fafournoux P and Bruhat A

*Nucleic Acids Res.* 35(17):5954-65, August 2007

TRB3 inhibits the transcriptional activation of stress-regulated genes by a negative feedback on the ATF4 pathway.

Jousse C, Deval C, Maurin AC, Parry L, Chérasse Y, **Chaveroux C**, Lefloch R, Lenormand P, Bruhat A, Fafournoux P.

*J Biol Chem.* 282(21):15851-61, March 2007

### **Synthèse scientifique:**

Adaptation to amino acids limitation in mammals: Mechanisms involved in the regulation of gene expression.

**Chaveroux C.**, Lambert-Langlais S., Cherasse Y., Averous J., Jousse C., Maurin AC., Laurent Parry L., Valérie Carraro V., Bruhat A. and Fafournoux P.  
Soumise à Biochimie.

Amino acids as regulators of gene expression in mammals: molecular mechanisms.

Bruhat A, Chérasse Y, **Chaveroux C**, Maurin AC, Jousse C, Fafournoux P.

*Biofactors.* 2009 May-Jun;35(3):249-57.

# SOMMAIRE

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>7</b>
<b>1. Objectif du travail de thèse .....</b>	<b>7</b>
<b>2. Présentation du manuscrit.....</b>	<b>8</b>
<b>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>9</b>
<b>Chapitre I - Les acides aminés : Rôles physiologiques .....</b>	<b>9</b>
<b>1. Propriétés des acides aminés .....</b>	<b>9</b>
<b>2. Fonctions des acides aminés .....</b>	<b>10</b>
<b>3. Métabolisme des acides aminés .....</b>	<b>10</b>
3.1. Homéostasie des acides aminés.....	10
3.2. Digestion, absorption .....	11
3.3. Transport des acides aminés.....	11
3.4. Catabolisme oxydatif des acides aminés .....	12
3.5. Synthèse de novo des acides aminés .....	12
<b>4. Variations de la concentration plasmatique en acides aminés .....</b>	<b>13</b>
4.1. Régime riche en protéines .....	14
4.2. Malnutrition protéique.....	15
a) Sous-nutrition protéique .....	15
b) Régime déséquilibré en acides aminés .....	16
4.3. Agressions .....	17
<b>Chapitre II - Régulation de l'expression des gènes par les acides aminés chez la levure.....</b>	<b>18</b>
<b>1. Contrôle général de l'expression des gènes chez la levure.....</b>	<b>18</b>
1.1 La voie GCN2 .....	18
a) Description .....	18
b) Conséquences de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ .....	19
c) Régulation traductionnelle de GCN4 .....	20
<i>Structure de l'ARNm de GCN4.....</i>	<i>20</i>
<i>Traduction de GCN4 en présence d'acides aminés.....</i>	<i>20</i>
<i>Traduction de GCN4 au cours d'une carence en acides aminés.....</i>	<i>21</i>
1.2. La voie SPS: senseur membranaire d'acides aminés .....	21

a) Le complexe SPS .....	21
b) Au cours d'une carence en acides aminés .....	22
c) En présence d'acides aminés .....	22
1.3. La voie TOR.....	22
<b>2. Contrôle spécifique : la voie IPM-Leu3P .....</b>	<b>24</b>
<b>Chapitre III. Régulation de l'expression des gènes par les acides aminés</b>	
<b>chez les mammifères.....</b>	<b>26</b>
<b>1. Régulation de la traduction des ARNm par la disponibilité en acides aminés .....</b>	<b>27</b>
1.1. Régulation générale de la traduction par la disponibilité en acides aminés.....	27
a) Régulation de l'étape d'initiation.....	27
<i>Au niveau de la formation du complexe 43S</i> .....	27
<i>Au niveau de la fixation du complexe 43S</i> .....	28
<i>Au niveau de la régulation de l'activité du facteur eIF4A</i> .....	30
b) Régulation de l'étape d'élongation par le facteur d'élongation 2 (eEF2) .....	30
1.2. Régulation spécifique de la traduction au cours d'une carence en acides aminés ....	31
a) Régulation de la traduction de Cationic Amino acids Transporter 1 (CAT-1) .....	31
b) Régulation de la traduction de Activating Transcription Factor 4 (ATF4).....	32
c) Conclusion.....	33
<b>2. Régulation de la stabilité des ARNm par la disponibilité en acides aminés .....</b>	<b>33</b>
2.1. Introduction .....	33
a) Eléments régulateurs au niveau du 3'UTR .....	33
b) Eléments régulateurs au niveau du 5'UTR .....	34
2.2 Exemples de régulations de stabilité d'ARNm par la disponibilité en acides aminés	35
a) Régulation de CAT-1 .....	35
b) Régulation d'ATF3 .....	35
<b>3. Régulation de la transcription.....</b>	<b>35</b>
3.1. Mécanismes généraux de la transcription .....	36
a) Introduction .....	36
b) Les facteurs spécifiques de la transcription .....	36
c) Le remodelage chromatinien.....	37
<i>Acétylation des histones</i> .....	37
<i>Méthylation des histones</i> .....	37
<i>Phosphorylation des histones</i> .....	38

<i>Ubiquitinylation des histones</i> .....	38
3.2. Gènes modèles utilisés dans l'étude de la transcription régulée par les acides aminés .....	38
a) Asparagine Synthétase (ASNS) .....	38
b) C/EBP Homologous Protein (CHOP) .....	39
c) Activating Transcription Factor 3 (ATF3) .....	40
d) Conclusion .....	41
3.3. Elément cis-régulateur impliqué dans la réponse à une carence en acides aminés : l'AARE (Amino Acid Response Element) .....	41
a) Identification de l'AARE .....	41
b) Protéines impliquées dans la transcription AARE-dépendante .....	42
<i>Le facteur de transcription ATF4</i> .....	43
<i>Le facteur de transcription ATF2</i> .....	43
<i>Autres facteurs régulant l'activité de l'AARE</i> .....	45
c) Cinétique des événements de liaison des facteurs contrôlant la transcription de l'AARE, exemple de la régulation du gène <i>CHOP</i> .....	46
d) Rôles des facteurs ATF2 et ATF4 dans la régulation de la transcription AARE-dépendante .....	47
<i>Rôle d'ATF4</i> .....	48
<i>Rôle d'ATF2</i> .....	48
<i>Conclusion</i> .....	50
e) Voies de signalisation en amont d'ATF4 et ATF2 .....	50

## **Chapitre IV. Les voies de signalisation des Mitogen Activated Protein**

<b>Kinases</b> .....	<b>51</b>
<b>1. Les MAPKs : deux groupes de kinases distincts</b> .....	<b>52</b>
1.1. Les MAPKs « conventionnelles » .....	52
a) Les Extracellular signal-Regulated Kinases 1 et 2 (ERK1/2) .....	52
b) ERK5 .....	53
c) Les Stress Activated Protein Kinases (SAPKs) .....	54
<i>p38</i> .....	54
<i>Les c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinases (JNK)</i> .....	55
1.2. Les MAPKs « atypiques » .....	56
a) ERK 3, 4 et 7 .....	57

<i>ERK3/4</i> .....	57
<i>ERK7</i> .....	58
b) La Nemo Like Kinase (NLK) .....	58
<b>2. Activation des MAPKs</b> .....	<b>59</b>
2.1. Activation de ERK1/2 .....	59
a) Activation par les récepteurs Tyrosine Kinase.....	59
b) Activation par les Récepteurs Couplés aux Protéines G.....	60
c) Activation par les intégrines.....	61
2.2. Activation de JNK.....	61
2.3. Activation de p38 .....	63
<b>3. Mécanismes de régulation de l'activité des MAPKs</b> .....	<b>63</b>
3.1. Les sites d'ancrage (ou docking-site) des MAPKs .....	64
a) Sites d'ancrage des facteurs de transcription à la kinase .....	64
b) Sites d'ancrage impliqués dans l'assemblage des modules MAPK.....	65
c) Sites d'ancrage d'autres partenaires des MAPKs .....	66
3.2. Les phosphatases des MAPKs.....	66
a) Les phosphatases à double spécificité (ou DUSP) .....	66
b) Les PTP (Protein Tyrosine Phosphatases) .....	67
c) Les sérine/thréonine phosphatases .....	68
<i>Les PPP régulant les voies MAPK (PP2A et PP5)</i> .....	68
<i>Les PPM régulant les voies MAPK</i> .....	69
3.3. Les protéines d'échafaudage .....	70
a) Les protéines d'échafaudage de la voie ERK .....	70
b) Les protéines d'échafaudage de JNK.....	72
c) Les protéines d'échafaudage de p38 .....	73
<b>4. Rôles des MAPKs dans la réponse un déficit en acides aminés indispensables</b> .....	<b>73</b>
4.1. Implication de la voie ERK1/2.....	74
4.2. Implication de la voie JNK.....	75
4.3 Conclusions .....	76
<b>RESULTATS</b> .....	<b>78</b>
<b>1. Objectif de la thèse</b> .....	<b>78</b>
<b>2. Publication: Identification of a novel amino acid response pathway triggering ATF2 phosphorylation in mammals</b> .....	<b>79</b>

<b>1. Introduction .....</b>	<b>79</b>
<b>2. Modèles utilisés .....</b>	<b>80</b>
2.1. Les cellules en culture .....	80
2.2. La carence en leucine .....	80
2.3. Le gène <i>ATF3</i> .....	80
<b>3. Principale technique utilisée : les ARN interférences .....</b>	<b>81</b>
<b>4. Publication .....</b>	<b>82</b>
<b>5. Résultats .....</b>	<b>83</b>
5.1. ATF2 est essentiel à la transcription AARE-dépendante d' <i>ATF3</i> .....	83
5.2. La phosphorylation d'ATF2 est indépendante des voies mGCN2 et mTORC1 .....	83
5.3. ATF2 est phosphorylé sur les résidus thréonines 69 et 71 en réponse à la carence en leucine .....	84
5.4. La phosphorylation d'ATF2 nécessite l'activation du module MAPK : MEKK1>MKK7>JNK2, .....	84
5.5. Le module MAPK est régulé en amont par deux GTPases : Rac1 et Cdc42, ainsi qu'une protéine G : Gα12.....	85
5.6. La voie Gα12/ATF2 contrôle l'expression d' <i>ATF3</i> et <i>CHOP</i> en réponse à une carence en leucine .....	85
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>86</b>
<b>1. Caractérisation et rôle d'ATF2 .....</b>	<b>87</b>
1.1 Sites de phosphorylation d'ATF2 .....	87
a) Phosphorylation des thréonines 69/71 d'ATF2 par JNK2 .....	87
b) Phosphorylation de la sérine 90 d'ATF2 en réponse à la carence en acides aminés .....	89
1.2. Rôle de la phosphorylation d'ATF2 sur la transcription AARE-dépendante .....	89
1.3. Rôle des phosphatases d'ATF2 .....	91
<b>2. Régulation du module MAPK en réponse à une carence en acides aminés.....</b>	<b>91</b>
2.1. Rôle de JNK1 .....	91
2.2. Activation de JNK2.....	92
2.3. Protéines régulatrices du module MAPK.....	92
a) Régulation du module par les phosphatases.....	92
b) Régulation du module par les protéines adaptatrices.....	93
<b>3. Eléments activateurs du module MAPK au cours d'une carence en acides aminés .....</b>	<b>94</b>
3.1. Rôles des GTPases Rac1 et Cdc42.....	94



3.2. Identification des partenaires de Gα12.....	95
a) Sous-unités Gβ et Gγ.....	95
b) Guanine exchange Factors (GEFs) .....	95
3.3. Identification du récepteur membranaire .....	96
<b>4. Autres cibles et rôle de la voie Gα12/ATF2 dans la régulation des fonctions physiologiques.....</b>	<b>97</b>
4.1. Activité de la voie Gα12/ATF2 <i>in vivo</i> .....	97
4.2. Autres voies de signalisation initiées par Gα12 en réponse à une carence en acides aminés.....	98
<b>CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>100</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>101</b>
<b>Articles scientifiques.....</b>	<b>102</b>
Amino acid limitation regulates the expression of genes involved in several specific biological processes through GCN2-dependent and GCN2-independent pathways..	102
Amino-acid limitation induces the GCN2 signaling pathway in myoblasts but not in myotubes. ....	103
Role of the repressor JDP2 in the amino acid-regulated transcription of CHOP.....	104
The p300/CBP-associated factor (PCAF) is a cofactor of ATF4 for amino acid-regulated transcription of CHOP. ....	105
TRB3 inhibits the transcriptional activation of stress-regulated genes by a negative feedback on the ATF4 pathway. ....	106
<b>Synthèses scientifiques .....</b>	<b>107</b>
Adaptation to amino acids limitation in mammals: Mechanisms involved in the regulation of gene expression. ....	107
Amino acids as regulators of gene expression in mammals: molecular mechanisms.	108
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>109</b>

# INTRODUCTION GENERALE

# **INTRODUCTION GENERALE**

Au cours de l'évolution, des mécanismes de régulation génique sont apparus pour permettre aux organismes de s'adapter au milieu environnant. Les glucides, lipides, acides aminés, ions et autres molécules présentes dans l'environnement sont peu à peu devenus des régulateurs extrêmement efficaces de l'expression des gènes. Ainsi chez les organismes unicellulaires, les nutriments sont les principaux régulateurs géniques. Par exemple, les opérons lactose, histidine ou tryptophane permettent aux bactéries d'adapter leurs métabolismes à la disponibilité en glucides et en acides aminés.

Chez les êtres multicellulaires, et en particulier chez les mammifères, la régulation de l'expression des gènes par les nutriments est plus complexe. Les composantes nerveuses et endocriniennes sont également capables de réguler l'expression des gènes en intégrant les informations provenant à la fois des différents tissus ainsi que des variations d'apport nutritionnel. Toutefois, des mécanismes plus anciens ont été conservés permettant aux nutriments de réguler directement l'expression des gènes, indépendamment de leurs effets sur les systèmes nerveux et endocriniens. Dans ce domaine, parmi les trois macro-nutriments, les effets des glucides et des lipides ont été les plus étudiés. Ceci a permis de mettre en évidence leur rôle de régulateur de leur propre métabolisme mais aussi de processus biologiques tels que la différenciation cellulaire. Les acides aminés sont aussi capables de réguler l'expression des gènes chez les mammifères. Dans de nombreuses situations physiologiques ou physiopathologiques, les concentrations plasmatiques en acides aminés peuvent présenter des variations importantes. Dans ces conditions, ils sont susceptibles de jouer un rôle signal important dans la réponse adaptative via la régulation de gènes cibles, dans différents tissus. Cependant, dans la plupart des cas, les voies de signalisation impliquées ne sont pas encore très bien décrites. Une caractérisation précise de celles-ci permettrait de mieux comprendre les mécanismes moléculaires régulés par la disponibilité en acides aminés et ainsi de déterminer *in vivo* les fonctions physiologiques contrôlées par ce type de nutriment.

## **1. Objectif du travail de thèse**

L'objectif de cette thèse a donc été de contribuer à la caractérisation des aspects moléculaires de la régulation de l'expression des gènes par les acides aminés chez les mammifères. L'accent a notamment été mis sur la détermination d'une nouvelle voie de signalisation

activée par le déficit en acide aminé. Pour cela, nous avons choisi une approche ciblée qui a permis l'identification d'une voie de signalisation contrôlant la phosphorylation du facteur ATF2, dans le modèle de la régulation du gène ATF3 (*Activating Transcription Factor 3*) au cours d'une carence en acides aminés.

## **2. Présentation du manuscrit**

Ce manuscrit est présenté selon six grandes sections : **1.** l'Etude bibliographique, **2.** les Résultats, **3.** les Discussions et perspectives, **4.** la Conclusion générale de ce travail **5.** les Annexes et enfin **6.** les Références bibliographiques.

La première d'entre elles sera sous divisée en quatre chapitres. En premier lieu, seront abordés les acides aminés et leurs rôles physiologiques. Puis, les deuxième et troisième chapitres traiteront des mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de l'expression des gènes par les acides aminés respectivement chez deux types d'eucaryotes : la levure et le mammifère. La dernière partie de l'étude bibliographique présentera la signalisation des Mitogen-Activated-Protein-Kinases (MAPKs) dont l'importance dans le modèle de carence en un acide aminé sera démontrée.

Les Résultats de mon projet principal seront présentés dans la deuxième partie sous forme d'une publication.

Puis, ces données seront discutées et les perspectives de ces travaux seront décrites dans la troisième section, avant de conclure sur ce travail.

Les deux dernières parties de ce manuscrit comportent : les Annexes où seront regroupés les travaux auxquels j'ai également pu participer, et les Références bibliographiques ayant été citées dans cette thèse.

# ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

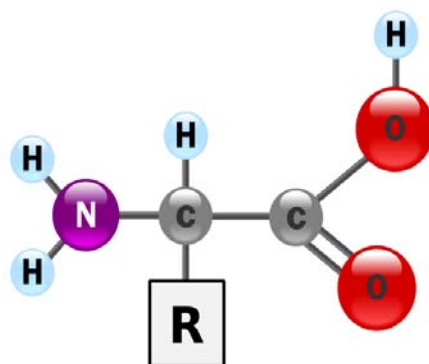
# **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

## **Chapitre I - Les acides aminés : Rôles physiologiques**

### **1. Propriétés des acides aminés**

Découverts au début du XIX<sup>ème</sup> siècle, les acides aminés sont des molécules organiques caractérisées par un squelette carboné et deux groupes fonctionnels : une amine (-NH<sub>2</sub>) et un acide carboxylique (-COOH) (Figure 1). Il existe dans la nature plusieurs centaines d'acides aminés, mais seulement 20 peuvent se fixer sur les ARN de transfert (ARNt) afin de participer à la synthèse protéique chez les eucaryotes supérieurs. Ce sont les acides  $\alpha$ -aminés naturels. Structuellement, ces acides aminés sont constitués d'un carbone dit «  $\alpha$  » auquel est rattaché le groupe carboxylique. De plus, ils peuvent contenir une chaîne latérale spécifique permettant de classer les acides aminés selon les propriétés chimiques de celle-ci. Ainsi huit "familles" ont pu être identifiées : aliphatiques hydrophobes, aromatiques hydrophobes, amidés, aromatiques hydroxylés, hydrophiles hydroxylés, soufrés, dibasiques et diacides. Cependant plusieurs types de classements sont possibles puisque certains acides aminés peuvent entrer dans plusieurs catégories (Tableau 1). Un autre acide aminé entrant dans la synthèse protéique est considéré comme le 21<sup>ème</sup> acide  $\alpha$ -aminé : la sélénocystéine. Elle dérive métaboliquement de la sérine dont l'atome de soufre a été remplacé par du sélénium. Elle est codée par le codon UGA, normalement un codon stop, qui, lorsqu'il est placé dans un contexte particulier de l'ARNm : la séquence SeCIS, va incorporer la sélénocystéine. Les protéines comportant un résidu sélénocystéine sont alors appelées des sélénoprotéines (Papp et al, 2007).

Parmi ces 20 acides aminés, tous ne peuvent pas être synthétisés par l'organisme et doivent alors être fournis par l'alimentation. Ils sont donc qualifiés d'acides aminés indispensables. Les travaux de Rose W.C., avec des régimes composés d'acides aminés purifiés, ont permis de déterminer le premier acide aminé essentiel : la thréonine (Rose, 1937). Depuis, 9 acides aminés indispensables pour l'Homme ont été caractérisés (Tableau 2) (Young et al, 1994).



**Figure 1 : Représentation de la structure chimique des acides alpha aminés.** R représente la chaîne latérale spécifique à chaque acide aminé.

Aliphatiques hydrophobes	Aromatiques hydrophobes	Amidés	Aromatique hydroxylés	Hydrophiles hydroxylés	Soufrés	Dibasiques	Diacides
Glycine (Gly; G)	Phénylalanine (Phe; Y)	Asparagine (Asn; N)	Tyrosine (Tyr; Y)	Sérine (Ser; S)	Cystéine (Cys; C)	Lysine (Lys; K)	Aspartate (aussi appelé Acide Aspartique Asp; D)
Alanine (Ala; A)	Tryptophane (Trp; W)	Glutamine (Gln; Q)		Thréonine (Thr; T)	Méthionine (Met; M)	Arginine (Arg; R)	Glutamate (aussi appelé Acide Glutamique Glu; E)
Valine (Val; V)						Histidine (His; H)	
Leucine (Leu; L)							
Isoleucine (Ile; I)							
Proline (Pro; P)							

**Tableau 1 : Classement des acides aminés selon leurs caractéristiques chimiques.** Entre parenthèse sont indiqués les noms abrégés des différents acides aminés.

Acides aminés indispensables	Acides aminés non indispensables
<b>Isoleucine</b> <b>Leucine</b> <b>Valine</b> <b>Lysine</b> <b>Méthionine</b> <b>Thréonine</b> <b>Phénylalanine</b> <b>Tryptophane</b> <b>Histidine</b>	<b>Arginine</b> (indispensable chez le jeune) <b>Alanine</b> <b>Asparagine</b> <b>Aspartate</b> <b>Glutamate</b> <b>Sérine</b>
	<b>Acides aminés conditionnellement indispensables</b>
	<b>Glutamine</b> <b>Glycine</b> <b>Proline</b> <b>Cystéine (à partir de méthionine)</b> <b>Tyrosine (à partir de phénylalanine)</b>

**Tableau 2 : Classification des acides aminés chez l'Homme.** Lors de certaines conditions physiopathologiques, certains acides aminés non indispensables, synthétisés *de novo* par l'organisme, deviennent indispensables et doivent être impérativement apportés par l'alimentation : ce sont les acides aminés conditionnels. (adapté de Young *et al.*, 1994)

Toutefois, cette notion n'est pas stricte et peut dépendre de l'état physiologique de l'organisme. En effet, sous certaines conditions, un acide aminé non essentiel peut le devenir. C'est notamment le cas de la cystéine et de l'arginine chez l'enfant en croissance ou de la glutamine lors d'agression telles qu'un sepsis, une brûlure ou une opération chirurgicale. On parle alors d'acides aminés conditionnellement indispensables (Pohlandt, 1974) (Appleton, 2002; Morris, 2006; Tong & Barbul, 2004).

## **2. Fonctions des acides aminés**

Les acides aminés sont principalement connus pour leur rôle de substrats de la synthèse protéique. Ils peuvent également être impliqués dans différentes voies métaboliques (précurseurs du cycle de Krebs, du cycle de l'urée, de la néoglucogenèse). Cependant de nouvelles fonctions sont régulièrement répertoriées (Tableau 3). Ainsi, les acides aminés peuvent assurer la fonction d'hormones, de neurotransmetteurs ou encore de molécules "signal". Ainsi ils participent à la synthèse de neuromédiateurs naturels (GABA, glutamate). Certains sont des précurseurs d'hormones (sérotonine, catécholamines), de molécules "signal" (arginine → monoxyde d'azote radicalaire NO°, stimulant les défenses immunitaires ou encore aboutissant à une vasodilatation de l'endothélium vasculaire) ou de nucléotides (glycine → purines, aspartate → pyrimidines).

## **3. Métabolisme des acides aminés**

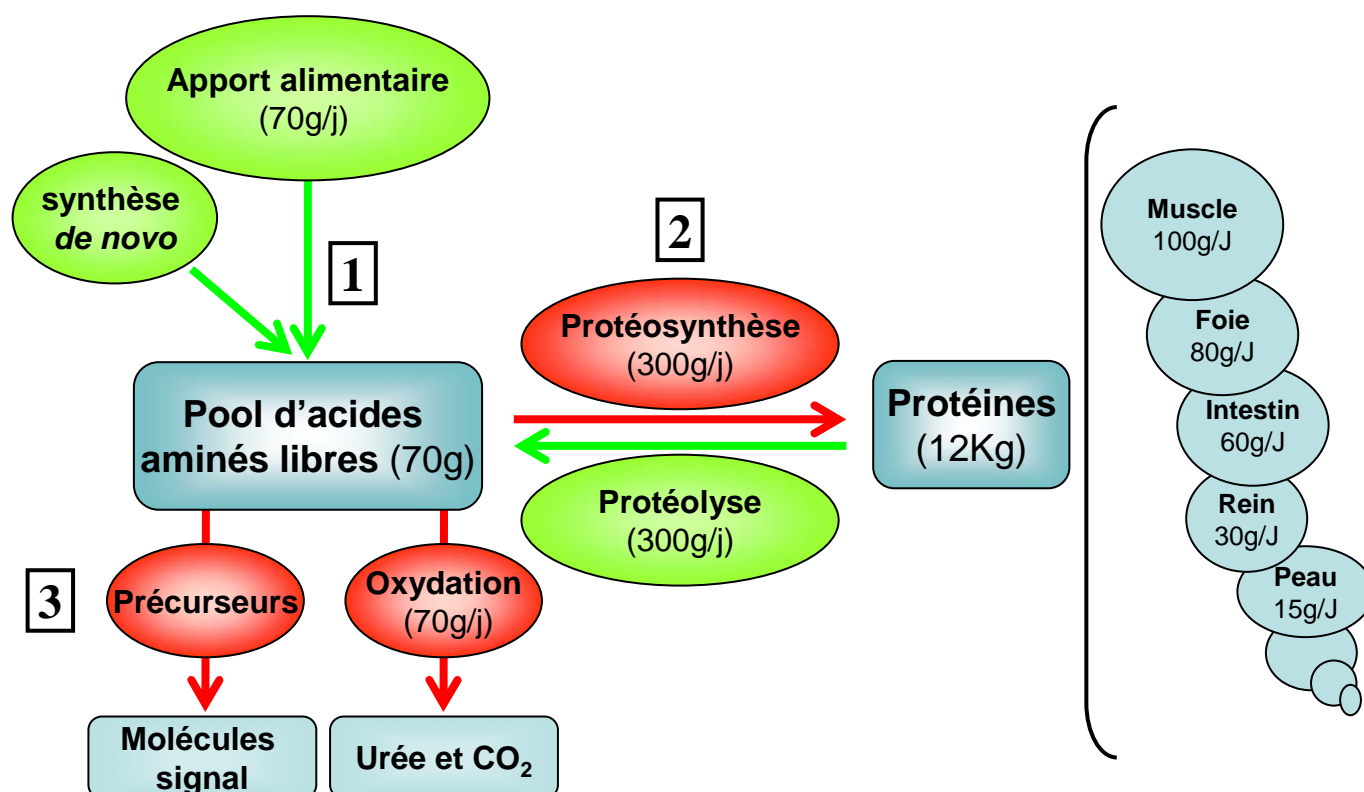
### **3.1. Homéostasie des acides aminés**

Le renouvellement des protéines chez l'adulte sain se fait à hauteur d'environ 300g quotidiennement, soit 3% de la masse protéique par jour. Ce processus nécessite donc un apport quotidien en acides aminés libres afin de reconstituer les protéines dégradées. L'OMS préconise, pour un adulte sain, un apport journalier de 0,8g/Kg (valeur exprimée en gramme de protéine par kilogramme de poids corporel) (Cano N., 2007). Au sein de l'organisme, le pool d'acides aminés libres est en équilibre dynamique entre les flux "entrant", augmentant ce pool, et les flux "sortant", le diminuant. Les entrées proviennent des apports alimentaires, de la dégradation des protéines et de la synthèse *de novo*. A l'inverse, les sorties sont la protéosynthèse, le catabolisme des acides aminés et leur utilisation en tant que précurseurs (Figure 2). Lorsque la proportion de l'un de ces mécanismes varie, l'organisme module les autres flux afin de répondre à ses besoins. Or, contrairement aux autres macronutriments, il



FONCTIONS	EXEMPLES
Régulateurs du turnover protéique	Leucine, Arginine
Précurseurs de médiateurs	Arginine (NO°)
Réactions de méthylation	Méthionine
Neurotransmetteurs	Tryptophane (sérotonine), Glutamate
Précurseurs de molécules biologiques	Arginine (créatine), Glutamine (purines)
Transporteur d'azote	Alanine, Glutamine
Pouvoir antioxydant	Cystéine
Précurseurs d'acides aminés	Méthionine (cystéine) Phénylalanine (tyrosine)
Néoglucogenèse	Alanine, Sérine, Glutamine, Proline

**Tableau 3: Exemples de fonctions des acides aminés, en dehors de leur rôle de substrats de la protéosynthèse.** Les acides aminés sont désignés en fonction de leurs couleurs attribuées dans le tableau 2 (d'après Young *et al.*, 1994).



**Figure 2: Principaux systèmes responsables du maintien de l'homéostasie des acides aminés et des protéines chez l'homme.** Le "pool d'acides aminés libres" dépend, **1**) de l'apport de protéines alimentaires et de la synthèse d'acides aminés *de novo*, **2**) de la synthèse et dégradation des protéines, et **3**) de l'oxydation des acides aminés ou de leur utilisation pour la synthèse de molécules signal (hormones, neuromédiateurs,...). Les taux de renouvellement et les flux d'acides aminés journaliers pour un adulte sain d'environ 80 Kg sont indiqués entre parenthèse (d'après Cano N. *et al.*, 2007).

n'existe pas d'organe dédié au stockage des acides aminés. Si l'un des acides aminés indispensable vient à manquer dans l'alimentation, il sera alors fourni par la dégradation de protéines "fonctionnelles". Cette compensation se fait donc au détriment de certains organes, essentiellement le muscle, le foie, et l'intestin et ne peut donc pas être permanente.

### **3.2. Digestion, absorption**

Après un repas, en situation post-prandiale, la digestion des protéines alimentaires commence au niveau de l'estomac où l'acidité gastrique ( $\text{pH}=2-4$ ) va les dénaturer. Cette étape facilite leur hydrolyse enzymatique par les diverses protéases contenues dans le suc gastrique, comme la pepsine. Le chyme (produit de la digestion gastrique) va être acheminé vers l'intestin grêle. Le contact du chyme alimentaire avec la muqueuse intestinale va stimuler la libération du suc pancréatique. Deux enzymes intestinales majeures vont agir à ce niveau : l'entérokinase et les aminopeptidases. L'entérokinase va activer les enzymes contenues dans les sucs pancréatiques (trypsine, chémotrypsine, carboxypeptidases) qui vont continuer la digestion débutée dans l'estomac et ainsi libérer des acides aminés et des oligopeptides. Les aminopeptidases et les peptidases liées à la membrane intestinale vont parachever le travail sur les oligopeptides en générant des acides aminés libres. Ceux-ci libres (voire certains peptides de petites tailles) vont alors traverser la membrane intestinale grâce à des transporteurs et seront amenés au niveau du foie par les veines mésentériques puis par la veine porte. Le foie joue un rôle central dans le métabolisme des acides aminés de part sa localisation (contrôle des substrats hydrosolubles issus de la digestion) et ses fonctions métaboliques. Il permet le catabolisme des acides aminés et est le seul organe possédant les enzymes nécessaires à l'uréogénèse. Ainsi, une grande partie des acides aminés glucoformateurs et dicarboxyliques (aspartate et glutamine) issus de la digestion sera utilisée pour la synthèse protéique hépatique, la néoglucogénèse et l'uréogénèse. En revanche, les acides aminés à chaîne ramifiée (leucine, isoleucine, valine) ainsi que la méthionine ne sont pas métabolisés par le foie. Ils vont donc passer dans la circulation périphérique où leur concentration peut être fortement augmentée en situation post-prandiale. C'est d'ailleurs pendant cette période que les acides aminés à chaîne ramifiée et le glutamate sont captés par le muscle squelettique et utilisés pour la synthèse protéique et la synthèse de glutamine.

### **3.3. Transport des acides aminés**

Les acides aminés ayant des propriétés chimiques très différentes, les systèmes de transport sont eux-mêmes complexes (Tableau 4). Schématiquement, il existe plusieurs systèmes de

SYSTEME	SPECIFICITE	DISTRIBUTION	COMMENTAIRES
Na <sup>+</sup> -dépendant			
A	Petits AA Neutres MeAIB	Ubiquiste	Réprimé par les AA et inductible par les hormones
ASC	Petits AA Neutres (pas le MeAIB)	Ubiquiste	
B	AA Neutres	Intestin	
Bo+	Large spécificité	Oocytes, intestin, rein	
Gly	Glycine, Sarcosine	Foie, Erythrocytes, Cerveau	
B	β-alanine, Taurine	Ubiquiste	Nécessite du Cl <sup>-</sup>
N	Gln, His, Asn	Foie	Réprimé par les AA
Nm	Gln	Muscle squelettique	
Anionique	Glu, Asp	Ubiquiste	Electrogénique
Na <sup>+</sup> -indépendant			
L (L1, L2)	AA ramifiés et aromatiques	Ubiquiste	
Y+	Lys, His, Arg	Ubiquiste	Electrogénique
T	AA aromatiques	Hépatocytes, Erythrocytes	
b(0,+)	AA neutres et chargés +		

**Tableau 4: Principaux systèmes de transport des acides aminés dans les cellules de mammifère.** Les transporteurs d'acides aminés sont classés en fonction de leurs propriétés cinétiques, physico-chimique et biologiques. Le MeAIB (Méthylamino-isobutyrate) est un inhibiteur spécifique du système A (d'après MacGivan & Pastor-Anglada, 1994; Hyde *et al*, 2003).

transport. Ils se distinguent selon le type d'acide aminé dont ils assurent le transport (neutre, anionique ou cationique) et par le fait qu'ils soient sodium-dépendant ou -indépendant. De plus pour un même système de transport, on trouve plusieurs isoformes ayant des localisations tissulaires, des paramètres cinétiques et des régulations différentes. Compte tenu de la non spécificité de la plupart de ces transporteurs, des phénomènes de compétition peuvent avoir lieu au sein d'un même transporteur entre différents acides aminés.

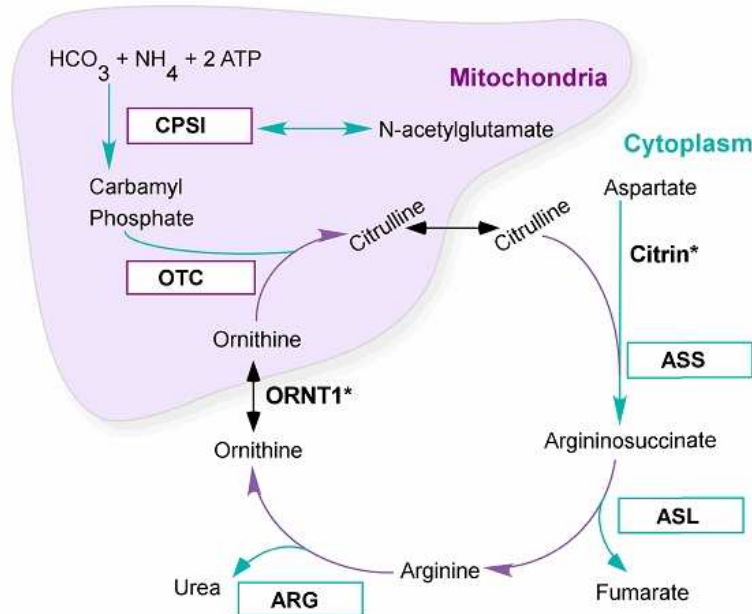
### **3.4. Catabolisme oxydatif des acides aminés**

Les acides aminés sont utilisés dans de nombreuses voies métaboliques. L'un des produits de ce catabolisme est la formation d'ion ammonium, toxique pour les cellules. Celui-ci doit alors être éliminé sous forme d'urée, principal produit d'élimination du métabolisme azoté chez les mammifères. La première étape de dégradation par oxydation des acides amines consiste en un transfert du groupement  $\alpha$ -aminé sur une molécule d' $\alpha$ -cétooglutarate (intermédiaire du cycle de Krebs), formant de l' $\alpha$ -cétoacide et du glutamate ( $AA-NH_2 + \alpha$ -cétooglutarate  $\rightarrow$   $\alpha$ -cétoacide + glutamate). Cette étape est appelée la transamination. Puis, le glutamate va être pris en charge par la glutamate synthase afin d'être conjugué avec l'ion ammonium pour former la glutamine. Ceci permet le transfert jusqu'au foie de l'ammoniac sous une forme neutre. Au niveau hépatique, la glutamine est à nouveau catabolisée en glutamate, libérant ainsi son ammoniac qui pourra alors être pris en charge par la machinerie enzymatique du cycle de l'urée (Figure 3). C'est l'étape de désamination.

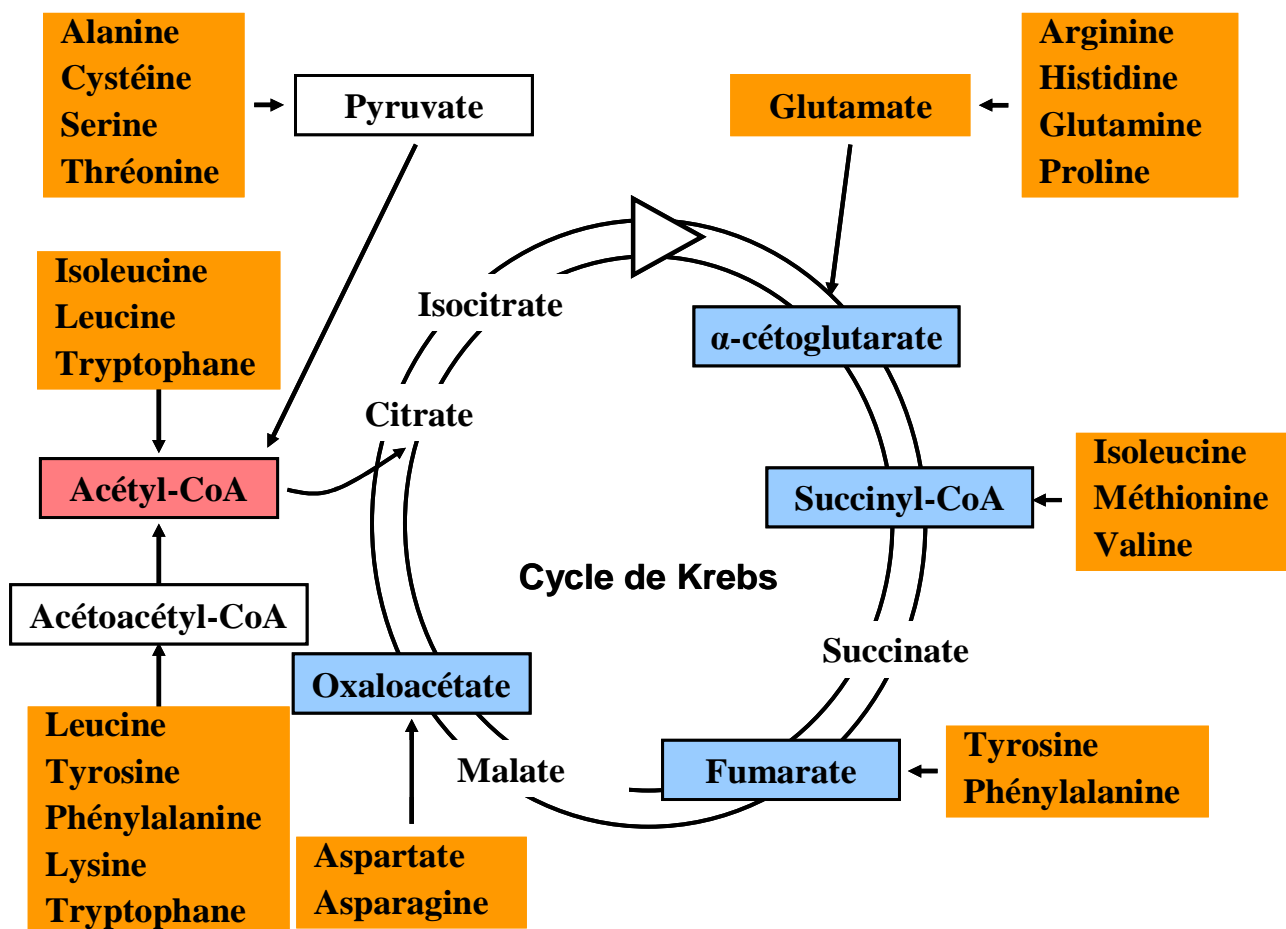
Le catabolisme des 20 acides  $\alpha$ -aminés aboutit à la formation de 7 composés : le pyruvate, des intermédiaires du cycle de Krebs (oxaloacétate,  $\alpha$ -cétooglutarate, succinyl-CoA et fumarate), l'acétyl-CoA et l'acétoacétyl-CoA (Lehninger, 1972). Les acides aminés servant de substrats pour la formation d'acétyl-CoA ou d'acétoacétyl-CoA sont dits « cétoènes » puisqu'ils contribuent à la formation de corps cétoniques. En revanche, ceux utilisés à la formation de pyruvate ou des intermédiaires du cycle de Krebs sont appelés glucogènes. En effet, ils peuvent être convertis en phosphoénolpyruvate afin d'alimenter la voie de la néoglucogénèse (Figure 4).

### **3.5. Synthèse de novo des acides aminés**

Les acides aminés non indispensables peuvent être synthétisés dans les cellules à partir de différents substrats. Deux types de réactions peuvent être mis en jeu : la transamination et la conversion. Dans le premier cas, les acides aminés vont être formés par transfert d'un groupement aminé sur un  $\alpha$ -cétoacide (Tableau 5). Ceci nécessite au préalable la formation de



**Figure 3: Cycle de l'urée.** Cet ensemble de réactions se déroule dans les hépatocytes. Il permet l'élimination de l'ammoniaque sous forme d'urée. ASS : Argininosuccinate synthetase, ASL : Argininosuccinate Lyase, ARG : Arginase, OTC : Ornithine transcarbamylase , CPSI : Carbamyl phosphate synthase I



**Figure 4: Voie d'entrée du squelette carboné des acides aminés dans le cycle de Krebs.** En rouge: composé cétogène, En bleu : composé glucogène (d'après Lehninger, 1972).

glutamate qui est la seule source de groupement  $\alpha$ -aminé à partir de l'ammoniaque ( $\text{NH}_3 + \text{acide } \alpha\text{-céto glutarique} + \text{NADPH, H}^+ \rightarrow \text{Acide L-glutamique} + \text{NADP}^+$ ). La génération de ce groupe est indispensable pour la synthèse des autres acides aminés. Par la suite, l'acide glutamique fournira le groupement  $\text{NH}_2$  pour former les autres acides aminés selon la réaction :  $\text{Acide glutamique} + \alpha\text{-cétoacide} \leftrightarrow \text{Acide } \alpha\text{-céto glutarique} + \text{Acide aminé}$ . Cette réaction est réversible et la nature de l'  $\alpha$ -cétoacide conditionne l'acide aminé formé. De cette manière, on obtient la synthèse de la sérine, du glutamate, de l'aspartate et de l'alanine.

Une autre voie de biosynthèse des acides aminés s'appelle la conversion. Elle consiste en la synthèse d'un acide aminé à partir d'un autre acide aminé précurseur (Tableau 5). Celle-ci peut être réversible dans le cas de la synthèse de sérine à partir de la glycine ou irréversible (synthèse de la cystéine, alanine, tyrosine, proline). Dans ce cas, deux acides aminés indispensables, la cystéine et la tyrosine, peuvent être synthétisés dans certaines circonstances en faible quantité à partir de la méthionine et de la phénylalanine, qui sont eux aussi des acides aminés indispensables.

Enfin l'arginine est un acide aminé synthétisé au cours du cycle de l'urée par la conversion de l'arginosuccinate en fumarate + L-Arginine.

## **4. Variations de la concentration plasmatique en acides aminés**

Après un repas, les acides aminés passent dans la circulation mésentérique avant d'être déversés dans la veine porte. De là, ils vont rejoindre le foie avant d'atteindre la circulation périphérique. Dans ce cas, les concentrations en acides aminés peuvent alors doubler dans le ce compartiment sanguin (par rapport à un état post-absorptif) voire atteindre des concentrations plus fortes au niveau du système porte. Ces variations de concentration peuvent varier d'avantage selon la composition en acides aminés du repas (Fafournoux et al, 1990) (Aoki et al, 1976). Ainsi lors d'une malnutrition ou sous-nutrition protéique ou, à l'inverse, lors de la consommation d'un régime riche en protéine, on observe une forte variation des concentrations individuelles en acides aminés plasmatiques comparativement à un état nutritionnel équilibré. Il peut également se produire d'importants changements des concentrations en acides aminés lors de situations pathologiques telles que le sepsis, les brûlures ou encore le cancer.

## **Synthèse d'acides aminés par transamination :**

Ac. Glutamique +  $\alpha$ -cétoacide  $\leftrightarrow$  Ac.  $\alpha$ -céto glutarique + Acide aminé

<b><math>\alpha</math>-cétoacide</b>		<b>Acide aminé</b>
Ac hydroxypyruvique	→	Sérine
Acide $\alpha$ -céto glutarique	→	Glutamate
Acide oxaloacétique	→	Aspartate
Acide pyruvique	→	Alanine

## **Synthèse d'acides aminés par conversion :**

### **Réaction réversible**

Glycine  $\leftrightarrow$  Sérine

### **Réactions irréversibles**

Méthionine	→	Cystéine par transsulfuration d'homocystéine
Phénylalanine	→	Tyrosine par hydroxylation
Aspartate	→	Alanine par décarboxylation
Glutamate	→	Proline par cyclisation

### **Autre :**

### **Synthèse de l'arginine au cours du cycle de l'urée (cf: Figure 3)**

Arginosuccinate → Fumarate + Arginine

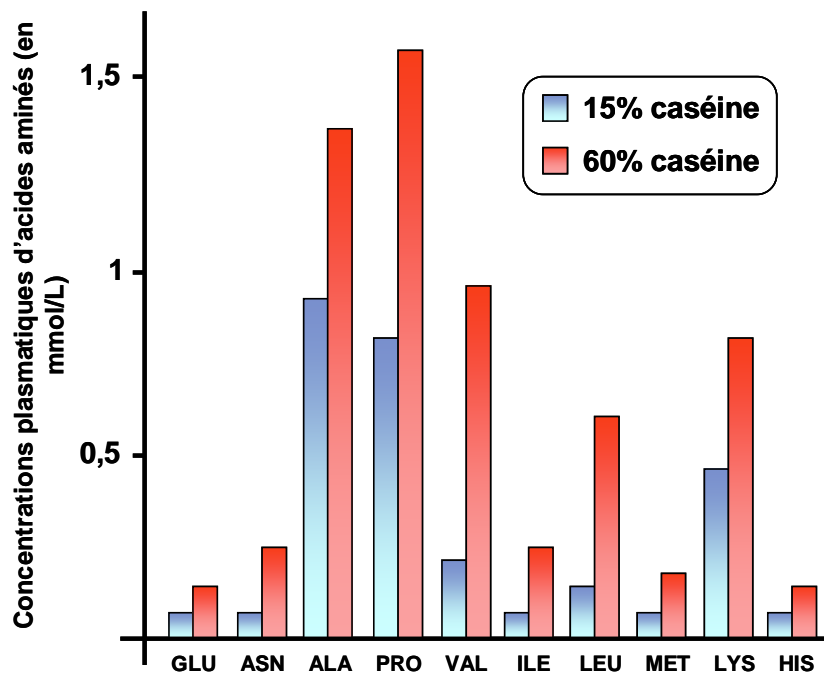
**Tableau 5 : Synthèse des acides aminés non indispensables par transamination ou conversion**

#### **4.1. Régime riche en protéines**

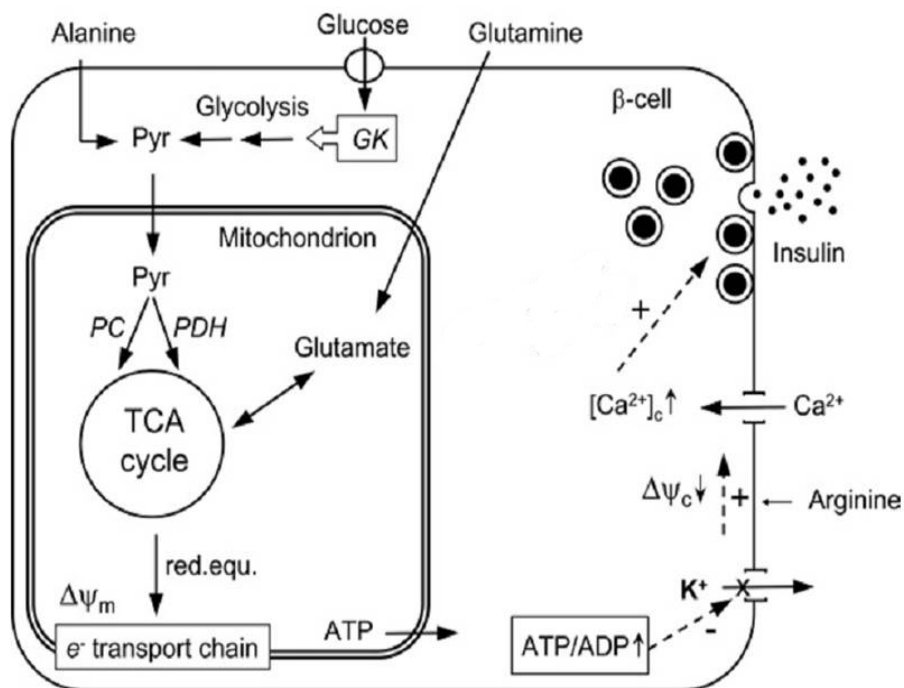
Suite à la consommation d'un régime riche en protéines, les concentrations plasmatiques de certains acides aminés peuvent être fortement augmentées (Figure 5). En effet, les concentrations des acides aminés non métabolisés par le foie (acides aminés branchés ou la méthionine) sont fortement accrues dans la circulation sanguine. Ainsi, la concentration en leucine peut doubler dans le sang périphérique (Aoki et al, 1976). Ces augmentations de concentration en acides aminés branchés (et particulièrement la leucine) stimulent fortement la synthèse protéique au niveau musculaire. Cette stimulation est due à l'activation par la supplémentation en acides aminés de la kinase mTOR (mammalian Target of Rapamycin) et les phosphorylations des facteurs impliqués dans la traduction : S6K1 et 4EBP1 (cf : chapitre II et III). L'arginine peut produire le même type d'effet mais dans un degré moindre (Bohe et al, 2003) (Borsheim et al, 2008).

Un autre effet de la supplémentation en acides aminés a été décrit : l'augmentation de la sécrétion d'insuline. Le laboratoire de R.H. Unger a démontré que la perfusion par voie intraveineuse d'acides aminés augmente fortement la sécrétion d'insuline chez le chien. Ces travaux ont ensuite été confirmés, l'injection de lysine, leucine et phénylalanine et surtout d'arginine induisant les plus fortes sécrétions d'insuline (Nair & Short, 2005). Cet effet est indirect et non dépendant de l'activation de la sécrétion de l'insuline par les transporteurs de glucose GLUT2. Toutefois, ce mécanisme est fortement similaire à celui emprunté par le glucose. La supplémentation en acides aminés (particulièrement en glutamate, glutamine et alanine) et leurs catabolismes vont augmenter la génération de métabolites intermédiaires (pyruvate, acétyl-CoA, oxaloacétate), stimulant le cycle de Krebs des cellules  $\beta$  du pancréas (Figure 6). Ceci va avoir pour conséquence la hausse de la production d'ATP et la fermeture des canaux potassiques sensibles au ratio ATP/ADP. L'arrêt de l'efflux d'ions  $K^+$  entraîne une dépolarisation membranaire et l'activation des canaux calciques, augmentant l'afflux intracellulaire de calcium. Cette entrée de  $Ca^{2+}$  provoque l'exocytose de l'insuline. La leucine stimule ce mécanisme en augmentant l'activité de la GDH (glutamate deshydrogénase). Ceci induit une augmentation des produits du catabolisme du glutamate entrant dans le cycle de Krebs. Egalement, certains résultats indiquent que l'afflux cellulaire d'arginine seule (fortement basique) pourrait induire la dépolarisation membranaire et de ce fait, la sécrétion d'insuline. La pertinence physiologique *in vivo* de ces données reste à déterminer (pour revue : (Newsholme et al, 2007)).





**Figure 5: Variation des concentrations plasmatiques en acides aminés dans le sang afférent au foie, chez des rats nourris avec un régime contenant 15 ou 60% de caséine.** (d'après Fafournoux *et al.*, 1990)



**Figure 6: Modèle de régulation de la sécrétion d'insuline dans la cellule  $\beta$  par le glucose et les acides aminés.** L'entrée de glucose et son catabolisme par la voie de la glycolyse entraînent l'augmentation intracellulaire de pyruvate et la stimulation du cycle de Krebs. La génération d'ATP va induire la fermeture des canaux  $K^+$ , une dépolarisation membranaire, et l'entrée de  $Ca^{2+}$  aboutissant à la sécrétion d'insuline. Le catabolisme des acides aminés comme l'alanine ou la glutamine fournissent des intermédiaires du cycle de Krebs, potentialisant la sécrétion d'insuline. La supplémentation en arginine, acide aminé basique, peut parvenir à dépolariser la membrane et aussi induire l'exocytose de cette hormone. GK: Glucokinase, TCA cycle : Tricarboxylique acide cycle (cycle de Krebs),  $\Delta\psi_{m/c}$  : potentiel membranaire mitochondrial/cellulaire (d'après Newsholme *et al.*, 2005).

Enfin, la supplémentation en acides aminés peut aussi avoir des effets nocifs sur l'individu. Les travaux de Block *et al.* montrent qu'une alimentation trop riche en un acide aminé spécifique (dans leur cas, la leucine) va provoquer une diminution de la concentration plasmatique en isoleucine et en valine (Block & Harper, 1991). En effet, ces trois acides aminés, appartenant à la même famille partagent les mêmes transporteurs. La surconsommation de leucine va alors provoquer un déplacement de l'équilibre naturel de la concentration de ces acides aminés et entraîner une forte compétition entre ces molécules, au niveau du transporteur. Ceci aboutit à une surcharge en leucine et inversement, à une carence en isoleucine et valine. Par conséquent, l'effet de ce type de compléments alimentaires peut se retrouver plus délétère que bénéfique.

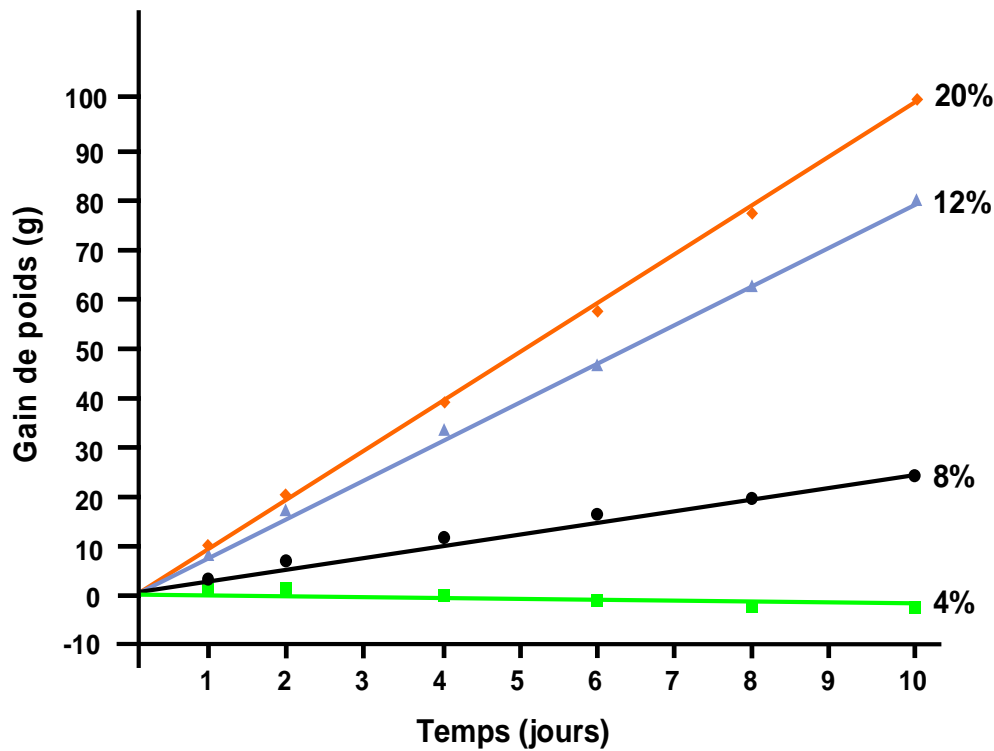
## **4.2. Malnutrition protéique**

Etant données les différentes propriétés des acides aminés (pas de stockage possible et caractère indispensable pour certains d'entre eux) ainsi que les multiples fonctions qu'ils assurent au sein de l'organisme, les cas de malnutritions protéiques sont particulièrement critiques. Deux types de malnutrition protéique seront abordés dans cette partie : la sous-nutrition protéique puis le régime déséquilibré en acides aminés.

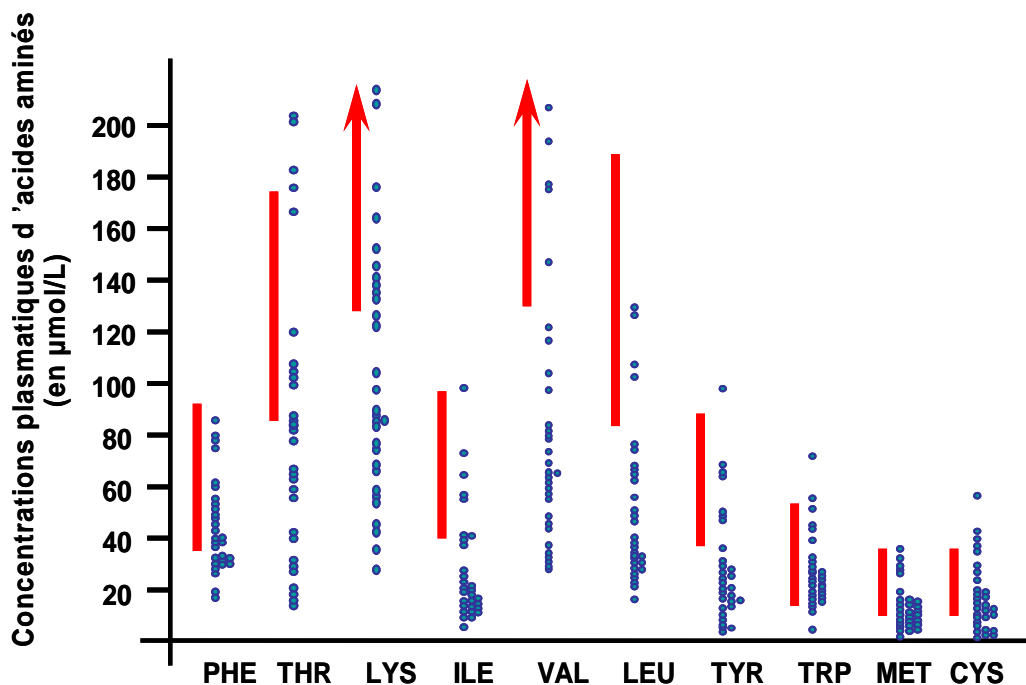
### **a) Sous-nutrition protéique**

La sous-nutrition protéique a des conséquences dramatiques, particulièrement lors de la période de croissance. Chez le jeune rat, un régime contenant un faible taux de protéines va entraîner une très forte diminution de la croissance (Figure 7) (Straus & Takemoto, 1990).

Chez l'Homme, la sous-nutrition protéino-énergétique est un état d'apport alimentaire insuffisant en protéine, et ce, sur une durée prolongée. Cette situation est retrouvée principalement dans les pays pauvres. Les formes les plus graves sont les cas de marasmes (développement avant l'âge de 1 an), kwashiorkor (apparition dès l'âge de 18 mois) et de kwashiorkor marasmique. Ces syndromes sont souvent associés à de multiples complications comme un fort retard de croissance, une perte musculaire, le développement d'œdèmes à l'abdomen ainsi que l'apparition de troubles digestifs et psychomoteurs, une immunodéficience, puis l'arrêt des fonctions vitales entraînant la mort (Jahoor et al, 2008). En cas de sous-nutrition protéique, on observe une forte diminution de la concentration plasmatique de la plupart des acides aminés essentiels. Par exemple, la concentration plasmatique en leucine chez ces enfants peut descendre jusqu'à 17 $\mu$ M au lieu de 100 à 200 $\mu$ M chez des sujets sains (Figure 8) (Baertl et al, 1974).



**Figure 7 : Effets d'une restriction protéique sur la croissance.** Le gain de poids de jeunes rats (34 jours) soumis ad libitum à un régime iso-calorique contenant 20%, 12%, 8% ou 4% de protéines est déterminé sur 10 jours. N=5 (d'après Straus & Takemoto, 1990)



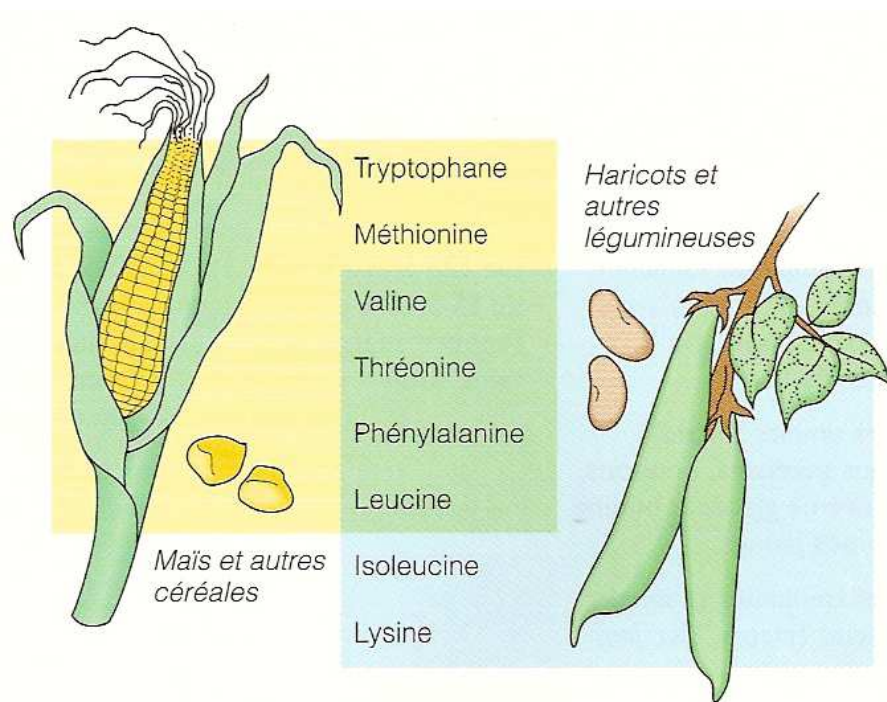
**Figure 8 : Concentrations plasmatiques des acides aminés mesurées chez de jeunes enfants sévèrement dénutris (kwashiorkor) à leur admission à l'hôpital.** Les barres rouges représentent la répartition des concentrations trouvées chez des enfants bien nourris. Chaque point bleu correspond à une concentration mesurée chez un patient (d'après Baertl *et al.*, 1974).

Le retard de croissance associé à la sous-nutrition protéique peut notamment s'expliquer par la stimulation de l'expression d'IGFBP1 résultant de la baisse de concentration des acides aminés circulants. Cette protéine a la capacité de se fixer aux IGF1/2 (Insulin Growth Factor 1/2) et d'inhiber leurs effets trophiques et métaboliques. La sous-nutrition protéique et la carence en acides aminés entraînent une surexpression très importante de l'ARNm et de la protéine d'IGFBP1 (Jousse et al, 1998) (Straus et al, 1993). Cette surexpression entraîne une augmentation de la séquestration des facteurs de croissance et contribuerait donc au retard de croissance observé.

### **b) Régime déséquilibré en acides aminés**

Le régime déséquilibré en acides aminés se différencie de la sous-nutrition protéino-énergétique de par le fait que : i) l'apport calorique n'est pas affecté dans ce type de régime, ii) la déplétion plasmatique ne concernera qu'un seul d'acide aminé ou celui d'une même famille.

Cette situation nutritionnelle peut être fréquente dans la nature. Un mammifère n'ayant pour seule source protéique des végétaux dépourvus en un acide aminé indispensable, peut se retrouver dans une situation de carence. Ainsi, certaines céréales, comme le blé, le maïs ou le riz, sont partiellement dépourvues en lysine. De même, la méthionine est présente en quantité insuffisante dans les légumineuses (lentilles, haricots secs, pois chiches) (Figure 9) (Ferreira et al, 2005; Marieb, 1999; Shekib, 1994). On parle alors de protéines « incomplètes », les besoins nutritionnels d'un individu en acides aminés ne pouvant pas être couverts par ces seuls aliments. Ce phénomène peut être amplifié par le rôle stimulateur des acides aminés circulants sur la protéosynthèse après un repas. Cette stimulation, notamment au niveau du muscle, va augmenter le captage des acides aminés sanguins et aggraver la carence induite par la consommation du régime déséquilibré. Toutefois, lorsqu'un animal se nourrit uniquement de ce type de régime, la déplétion plasmatique en l'acide aminé limitant va jouer un rôle signal au niveau cérébral, notamment dans la région de l'APC (Anterior Piriform Cortex) (Gietzen, 2000; Maurin et al, 2005). Ceci va conduire à une inhibition de la prise alimentaire et la mise en place d'une aversion pour ce régime ; l'animal considérant comme nocive cette source de nourriture ne couvrant pas tous ses besoins. Il faut noter que cette reconnaissance qualitative des acides aminés issus de la nourriture et la mise en place de l'aversion alimentaire sont des phénomènes extrêmement rapides (1 heure après le début du repas chez la souris) (Maurin et al, 2005).



**Figure 9 : Concentrations relatives en acides aminés indispensables du maïs (céréales) et des haricots (légumineuses) par rapport aux besoins chez l'homme.** Le maïs comporte une concentration en lysine et isoleucine trop faible pour subvenir aux besoins chez l'homme. A l'inverse, les légumineuses sont pauvres en tryptophane et méthionine. Il est donc nécessaire, dans le cadre d'un régime végétarien par exemple, de planifier ses apports en acides aminés en combinant différentes sources protéiques (d'après Marieb E.N., 1999)

### **4.3. Agressions**

Dans des situations d'agression de type trauma, cancer, brûlure, sepsis, fièvre, l'organisme peut se retrouver dans un état de balance azotée négative conduisant à une diminution importante de la masse corporelle (cachexie) (Chiolero et al, 1997; Lai et al, 2005). Les premières modifications du métabolisme protéique observables au cours de ces types d'agressions se traduisent par l'augmentation des pertes d'azote dans les urines. L'origine de cet azote est en fait musculaire. En réponse à l'agression, les acides aminés sont libérés grâce à la protéolyse de ce tissu, et redistribués vers d'autres organes privilégiés, en particulier le foie. Ces acides aminés seront utilisés pour la synthèse des protéines impliquées dans la réponse inflammatoire et pour la néoglucogenèse (Biolo et al, 1997). Ainsi, suite à une chirurgie ou à un trauma, on observe une forte déplétion plasmatique et intracellulaire en glutamine. Cet acide aminé jouera le rôle de transporteur d'azote pour la synthèse protéique dans le rein, le foie, le petit intestin et les cellules immunitaires. Plusieurs études cliniques préconisant la supplémentation de glutamine chez les malades rapportent un effet positif de ce régime sur la réponse immunitaire et la préservation de l'intégrité de l'intestin ainsi qu'une moindre perte de la glutamine intramusculaire par la protéolyse (Griffiths et al, 1999). Toutefois, ces processus complexes varient selon la nature et la durée du stimulus et leurs conséquences, sur le métabolisme des acides aminés, seront transitoires. Tous ces points ne seront pas abordés dans cette thèse.

# **Chapitre II - Régulation de l'expression des gènes par les acides aminés chez la levure**

Au cours de l'évolution, les cellules ont acquis la capacité de moduler l'expression de leurs gènes en réponse aux modifications de leur environnement. Chez les organismes unicellulaires, de nombreux mécanismes de régulation se sont mis en place pour leur permettre de métaboliser ou synthétiser de nombreux substrats en fonction de leurs disponibilités dans le milieu extérieur. Ainsi, chez la levure et la bactérie, la déplétion du milieu de culture en un acide aminé conduit à l'augmentation de l'expression de gènes codant les enzymes de la voie de biosynthèse de cet acide aminé. Cette régulation de l'expression des gènes par la disponibilité des acides aminés a été relativement bien caractérisée chez la levure. Plusieurs voies de signalisation ont été découvertes et étudiées. L'ensemble de ces voies est classé en deux groupes: tout d'abord le contrôle général, qui répond à n'importe quel acide aminé, et enfin le contrôle spécifique, dans lequel un acide aminé particulier régule sa propre biosynthèse.

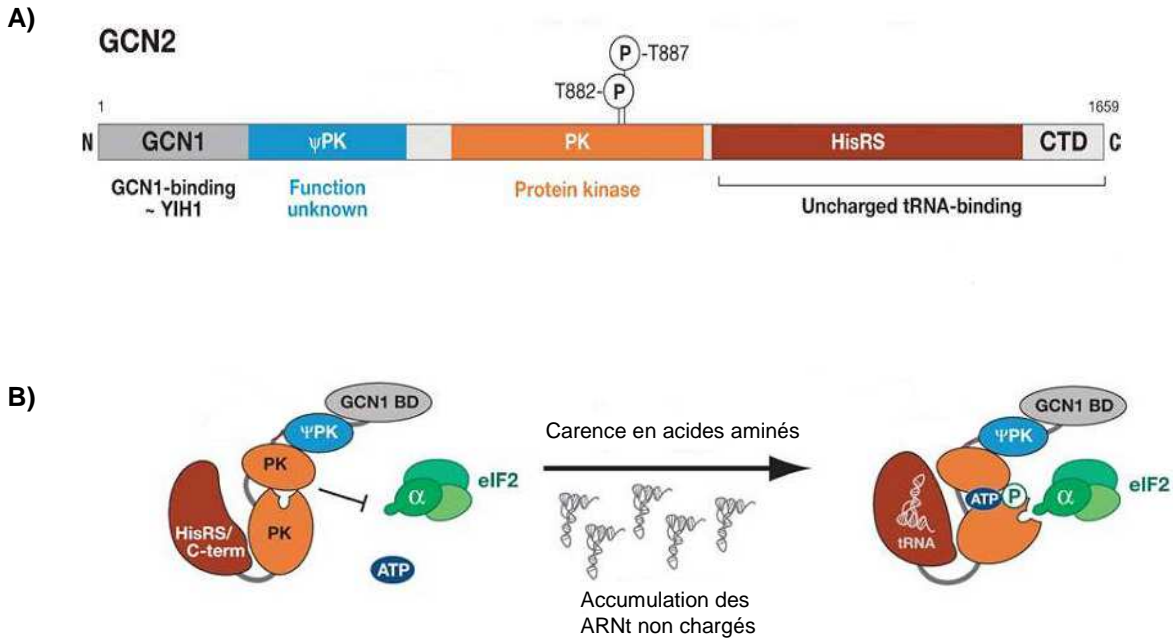
## **1. Contrôle général de l'expression des gènes chez la levure**

Ce contrôle général met en jeu trois grandes voies de signalisation : la voie GCN2, le système SPS et la voie TOR.

### **1.1 La voie GCN2**

#### **a) Description**

GCN2 a été identifiée au cours d'un criblage visant à déterminer les protéines impliquées dans la régulation de GCN4. Cette kinase contient 1659 acides aminés pour un poids moléculaire de 190KDa (Hinnebusch, 1984). Des études chez *Saccharomyces cerevisiae* ont montré qu'une carence en n'importe quel acide aminé conduit à une activation du domaine kinase de la protéine GCN2 (General Control Non-derepressible-2 ou eIF2 $\alpha$  kinase 4). Celle-ci comporte un segment ayant une forte homologie avec une partie de l'histidyl-ARNt synthétase (Figure 10). Ce domaine est capable de lier les ARNt non chargé et donc de détecter le rapport ARNt libres sur ARNt chargés. Ainsi, l'accumulation de des derniers, induite par la



**Figure 10: Structure de la kinase GCN2 et mécanisme d'activation par une carence en acides aminés chez la levure. A)** GCN2 est composée d'un domaine d'interaction avec GCN1, nécessaire pour son activation (GCN1), un domaine pseudokinase dont la fonction n'est pas connue ( $\psi$ PK), un domaine protéine kinase (PK) et un domaine de liaison des ARNt non chargés (HisRS). **B)** Lors d'une carence en acides aminés, l'accumulation d'ARNt non chargés est détectée par le domaine HisRS. Ceci induit l'autophosphorylation de la kinase GCN2, par son domaine PK (représenté en 2 lobes) sur les résidus thr882-887. Puis celle-ci phosphoryle la sous unité  $\alpha$  du facteur d'initiation eIF2 (d'après Hinnebusch, 2005).



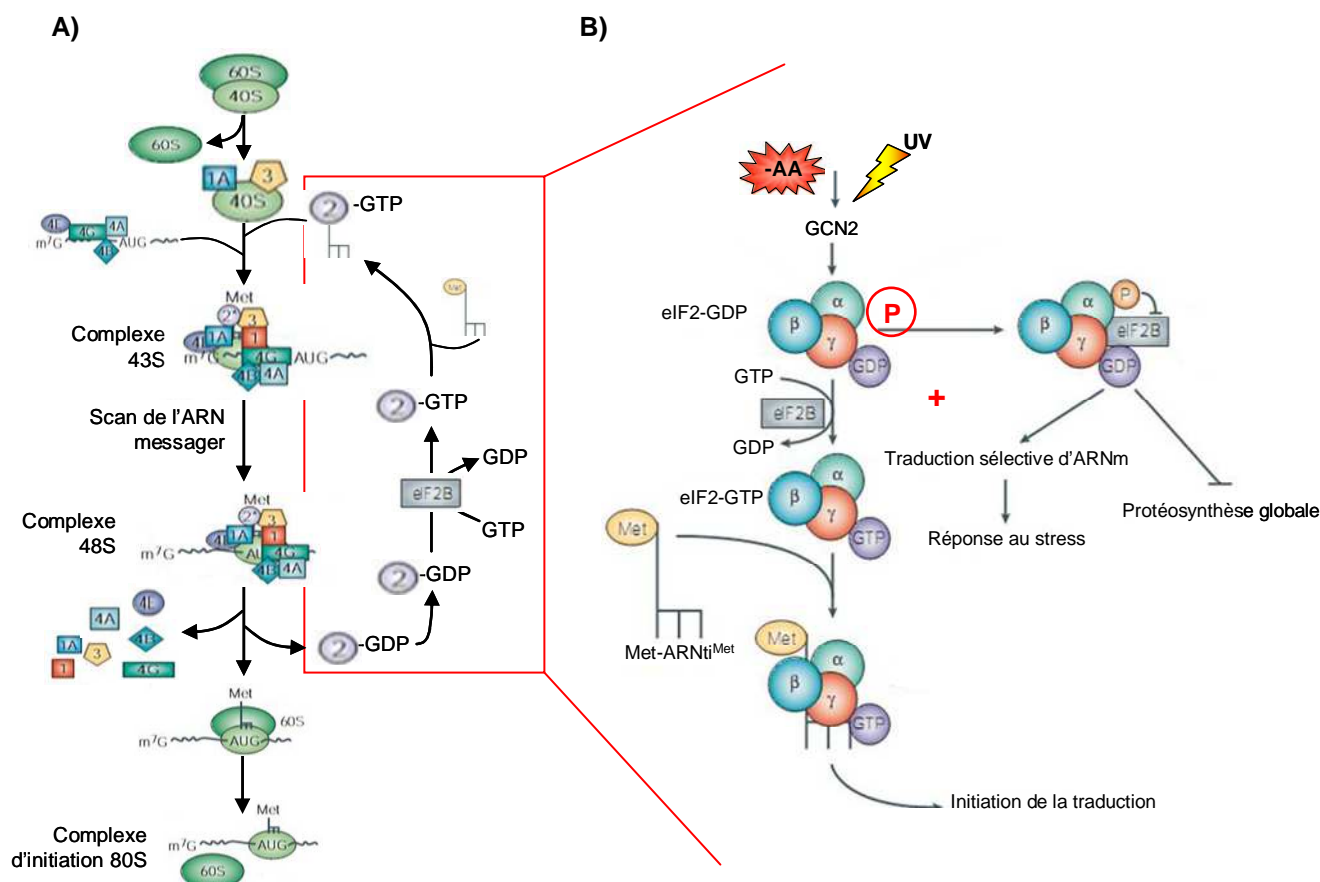
carence en acides aminés, provoque l'activation du domaine kinase et l'autophosphorylation de GCN2 sur les thr882 et thr887 (Hinnebusch, 2005; Wek et al, 1990) (Romano et al, 1998). Une fois activée, GCN2 va alors phosphoryler la sérine 51 de la sous-unité alpha du facteur d'initiation de la traduction eIF2 (eukaryotic Initiation Factor 2), seul substrat connu de cette kinase. Ceci va avoir pour conséquence une diminution de la traduction (Dever et al, 1992). Cependant, bien que la synthèse protéique globale soit inhibée, on observe une augmentation de la traduction d'un ARNm spécifique, codant pour la protéine GCN4 (General Control Non-depressible-4) (Ramirez et al, 1991). Il s'agit d'un facteur de transcription régulant l'expression d'un grand nombre de gènes impliqués dans la voie de biosynthèse et le métabolisme des acides aminés.

### **b) Conséquences de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$**

Chez la levure, GCN2 est la seule kinase connue comme étant capable de phosphoryler eIF2 $\alpha$  (Kubota et al, 2001). Or eIF2 $\alpha$  joue un rôle clé au cours de l'initiation de la traduction (Figure 11). En effet, en condition normale, il fait parti du complexe d'initiation ternaire : eIF2-GTP-Met-ARNt<sup>met</sup>. Ce dernier est lié au complexe de pré-initiation 40S pour former le complexe 43S et permet l'incorporation de l'ARNt initiateur (Met-ARNt<sup>met</sup>) au sein du ribosome. La liaison du 43S à l'extrémité 5' du messenger forme ainsi le complexe 48S. La reconnaissance du codon d'initiation AUG par l'ARNt<sup>met</sup> provoque alors la dissociation des facteurs d'initiation et notamment le relargage d'eIF2-GDP. Cet eIF2-GDP va être recyclé en eIF2-GTP par le facteur eIF2B et ainsi pouvoir reformer le complexe ternaire indispensable à la phase d'initiation de la traduction.

En condition de carence en acide aminé, la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  par GCN2 va inhiber l'échange de GDP en GTP par eIF2B. Ceci va avoir pour conséquence l'appauvrissement en complexe ternaire eIF2-GTP-Met-ARNt<sup>met</sup>, le complexe de pré-initiation 40S ne pourra donc pas être réinitié en sous-unité active 43S, provoquant, de ce fait, l'arrêt de la synthèse protéique en phase d'initiation. (Holcik & Sonenberg, 2005).

Récemment, les travaux de Grallert et Boye ont démontré un rôle de GCN2 dans le contrôle du cycle cellulaire. Des levures exposées aux UV ainsi qu'à des agents mutagènes (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, méthyle méthane sulphonate) retardent la transition de la phase G1 à S de manière GCN2-dépendante. Ce nouveau point de contrôle implique également la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  par GCN2 (Grallert & Boye, 2007) (Tvegard et al, 2007)



**Figure 11 : Intégration des signaux de stress GCN2-dépendant par eIF2α** A) Schéma général de l'initiation de la traduction chez les eucaryotes. eIF2 fait partie du complexe ternaire (eIF2-GTP-Met-ARNi<sup>Met</sup>) et doit être rechargé en GTP pour pouvoir initier la traduction. Ce rechargement est réalisé par le facteur eIF2B. B) Voie de signalisation GCN2/eIF2α. La kinase GCN2 peut être activée par autophosphorylation en réponse à une carence en acides aminés ou un traitement aux UV. Cette activation aboutit à la phosphorylation de la sous-unité α d'eIF2, facteur indispensable au complexe ternaire (eIF2, GTP et Met-ARNi<sup>Met</sup>). Cette phosphorylation inhibe le rechargement d'eIF2-GDP en eIF2-GTP et provoque une diminution de la traduction globale. Toutefois certains ARNm permettant l'adaptation cellulaire aux stress peuvent continuer à être traduits (d'après Holcik et Sonenberg, 2005).

### **c) Régulation traductionnelle de GCN4**

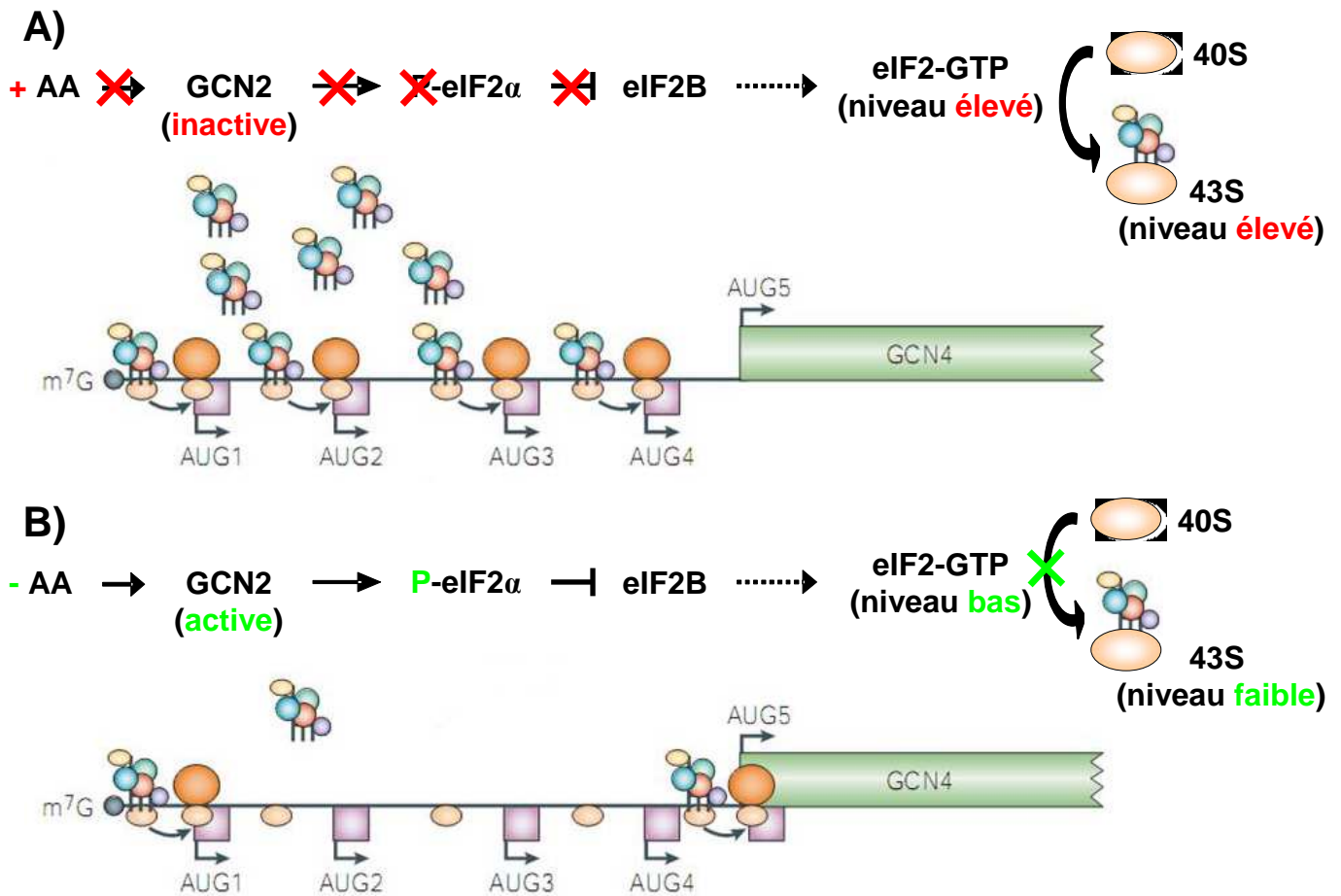
Comme décrit précédemment, l'activation de GCN2 et la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  va induire la hausse de l'expression du facteur GCN4. GCN4 est un facteur de transcription induisant l'expression de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme et la biosynthèse des acides aminés (Lucchini et al, 1984). La transcription du gène GCN4 est constitutive et la régulation majeure de GCN4 est réalisée au niveau traductionnel (Hinnebusch, 1993). Le domaine de liaison à l'ADN de GCN4 interagit spécifiquement avec la séquence régulatrice 5'-ATGA(C/G)TCAT-3' située dans la région promotrice des gènes cibles (Oakley & Dervan, 1990).

#### **Structure de l'ARNm de GCN4**

La régulation traductionnelle de GCN4 est un phénomène complexe. Dans la séquence 5' non traduite (5'UTR) de son ARNm, elle met en jeu quatre petits cadres de lecture ouverts appelés uORF (upstream Open Reading Frame), situés en amont de la séquence codante de GCN4 (Figure 12) (Thireos et al, 1984) (Mueller et al, 1988). Tous les ribosomes entrant à l'extrémité 5' de l'ARNm traduiront l'uORF1. Toutefois selon la disponibilité en acides aminés de la cellule, les uORFs suivants vont pouvoir être traduits ou non.

#### **Traduction de GCN4 en présence d'acides aminés**

En conditions non carencées, la forme active (non phosphorylée et liée à du GTP) d'eIF2 $\alpha$  est abondante. Tous les ribosomes entrant à l'extrémité 5' de l'ARNm traduiront l'uORF1. Puis, au niveau du codon stop de cet uORF1, le ribosome a deux possibilités : soit il décroche du messenger et la traduction est alors terminée, soit la petite sous-unité du ribosome (40S) peut continuer à balayer l'ARNm pour ré-initier la traduction au niveau des uORFs suivants. Ce choix se fera en fonction de la composition de la séquence de l'ARN en 3' du codon stop. En effet, une région riche en A et U est plutôt favorable à la continuation du scan de l'ARNm par la sous-unité 40S alors qu'une région riche en G et C est plutôt défavorable à ce mécanisme et provoque l'arrêt de la traduction. En l'occurrence, la séquence en aval de l'uORF1 de GCN4 est plutôt riche en A et U et donc favorable à la reprise du balayage de l'ARNm par les complexes 40S. Comme la quantité de complexes ternaires est suffisante, la capacité de réinitiation de la traduction au niveau des uORF 2, 3 ou 4 sera très forte. En revanche, contrairement aux séquences trouvées après les uORF 1/2/3, celle située en aval de l'uORF 4 contient un codon stop dont l'environnement est riche en G et C, peu favorable à la poursuite du balayage de l'ARNm par les ribosomes. Ainsi, tous les ribosomes ayant traduit l'uORF 4



**Figure 12: Régulation traductionnelle de GCN4.** Chez la levure, la traduction de ce facteur de transcription est régulée par quatre uORF contenant chacun un AUG. A) En condition non carencée, le niveau de phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  est faible. Ainsi les quantités de complexe eIF2-GTP et de complexes ternaires sont élevées, permettant uniquement d'initier la traduction au niveau de l'uORF 1 puis de la réinitier aux uORF2, 3 ou 4. Toutefois, la probabilité de réinitier ce mécanisme au niveau de l'uORF GCN4 (AUG5) reste faible provoquant un faible niveau de GCN4 produit B) Lors d'une carence en acides aminés, le niveau d'eIF2 $\alpha$  phosphorylé augmente, entraînant la diminution de la quantité de complexe eIF2-GTP et ne permettant plus aux ribosomes d'initier la transcription au niveau des uORF2 à 4. Ceci permet aux ribosomes de continuer à scanner l'ARNm d'initier la traduction au niveau de l'ORF de GCN4 (d'après Holcik et Sonenberg, 2005).

vont décrocher après ce codon stop. Par conséquent, aucun n'atteindra le codon AUG initiateur de GCN4 et la protéine ne sera pas traduite.

### Traduction de GCN4 au cours d'une carence en acides aminés

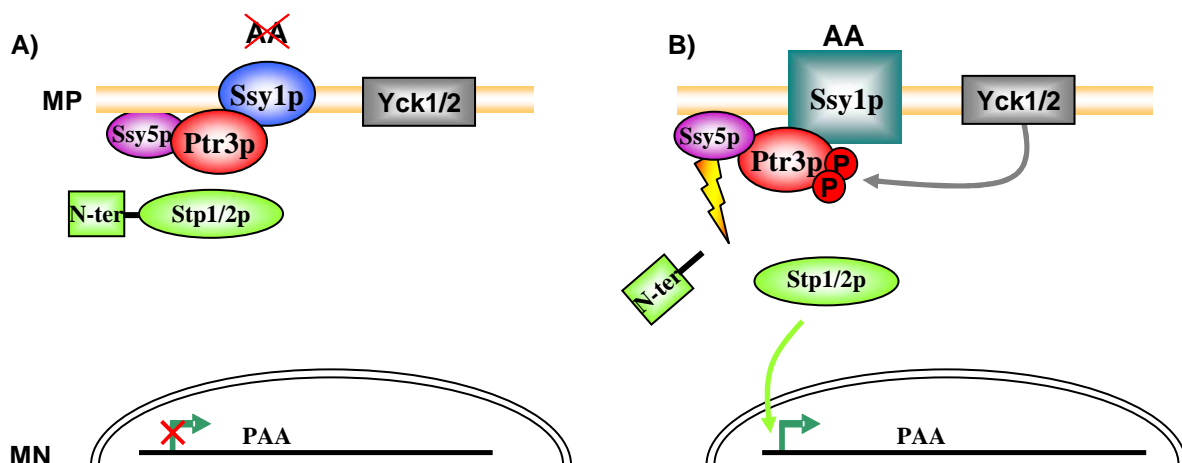
Dans des conditions de carence en acides aminés, eIF2 $\alpha$  sera phosphorylé par la protéine kinase GCN2, réduisant dramatiquement le niveau cellulaire de complexe ternaire eIF2-GTP-ARNti<sup>met</sup>. Ceci implique que les ribosomes, après avoir traduit l'uORF 1, parcourent de plus longues distances avant de refixer le complexe ternaire et donc reformer le complexe 48S. Ainsi un certain nombre de sous-unités du ribosome 40S dépasse les uORF2, 3 et 4 lors de la phase de balayage et ne démarre la traduction qu'au codon AUG de GCN4. Le niveau de traduction de ce facteur sera alors plus élevé. La protéine GCN4 traduite pourra alors agir comme activateur de la transcription d'un grand nombre de gènes (Abastado et al, 1991; Hinnebusch, 2005).

## **1.2. La voie SPS: senseur membranaire d'acides aminés**

La voie SPS a pour rôle de réguler l'expression de certains gènes en fonction de la disponibilité en acides aminés dans l'environnement. En particulier, elle peut réguler l'expression de gènes codant pour des perméases d'acides aminés (AAP: Amino-Acid Permease) : *AGP1*, *AGP2*, *BAP2*, *BAP3*, *ATA1*, *TAT2*, *GNP1*, *DIP5*, *AGP2* et *PTR2*. En l'absence d'acides aminés, l'expression de ces gènes est faible (Iraqi et al, 1999) (Forsberg & Ljungdahl, 2001)

### **a) Le complexe SPS**

Le complexe SPS est composé de trois protéines: Ssy1p, Ptr3p et Ssy5p, localisées au niveau de la membrane plasmique. Ssy1p possède la structure d'une perméase avec 12 segments transmembranaires dont les parties C et N-terminales sont cytoplasmiques. En revanche, cette protéine n'a pas d'activité de transport connue. Elle est cependant considérée comme le senseur du niveau d'acides aminés extracellulaires (Figure 13). La partie N-terminale de Ssy1 interagit physiquement avec Ptr3p et Ssy5p, fixées du côté cytoplasmique de la membrane cellulaire. Ptr3p est fixée à la membrane plasmique du côté cytosolique. Elle présente certaines homologues de séquence avec les perméases, et un domaine phosphorylable par deux "caséine kinases": Yck1 et Yck2, impliquées dans la stabilité de cette protéine. Ssy5p est une chymotrypsine-like serine protéase associée à la membrane plasmique. Des expériences de



**Figure 13: Régulation de l'expression des gènes par le complexe SPS chez la levure:**

**A)** En absence d'acides aminés, la protéine Ptr3p recouvre le site actif de Ssy5p. De ce fait, les facteurs de transcription Stp1/2p ont une localisation cytosolique. **B)** En présence d'acides aminés, la conformation de la protéine Ssy1p est modifiée, permettant le recrutement des caséine kinases Yck1/2. Ceci va induire une hyperphosphorylation de Ptr3p augmentant ainsi l'activité protéasique de Ssy5p et provoquant le clivage du domaine inhibiteur N-terminal des facteurs Stp1/2p. Ainsi libérés et activés, ceux-ci régulent positivement la transcription de gènes codant pour les perméases. MP : Membrane Plasmique, MN : Membrane Nucléaire, PAA : Perméases d'Acides Aminés (d'après Liu *et al.*, 2008).

double hybride ont mis en évidence une interaction de Ssy5p avec Ptr3p (Bernard & Andre, 2001) (Hundal & Taylor, 2009).

Par ailleurs, deux facteurs de transcription : Stp1p et Stp2p jouent un rôle clé dans l'induction des gènes cibles du système SPS et l'adaptation cellulaire à la concentration en acides aminés extracellulaires (Andreasson & Ljungdahl, 2002).

#### **b) Au cours d'une carence en acides aminés**

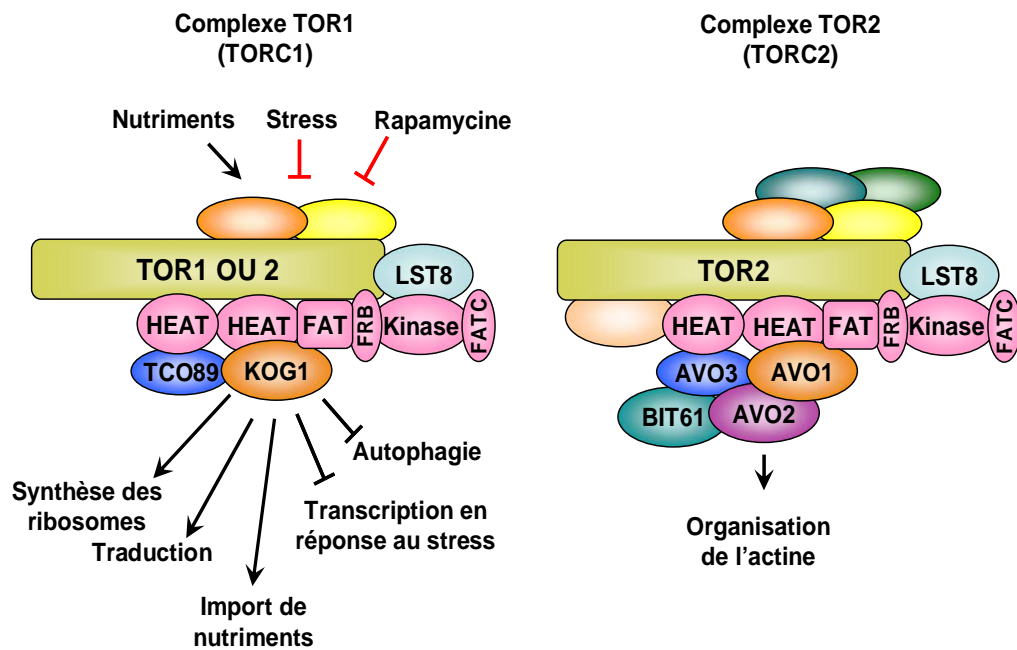
En l'absence d'acides aminés, la protéine Ptr3p est constitutivement liée à Ssy1p et Ssy5p couvrant ainsi le site actif de Ssy5p. De plus, le niveau de phosphorylation de Ptr3p est faible (Figure 13). Les facteurs de transcription Stp1p et Stp2p sont synthétisés sous leurs formes de précurseurs inactifs et sont localisés dans le compartiment cytosolique. Ainsi, ils ne peuvent induire la transcription des gènes codant pour les perméases (Ljungdahl, 2009).

#### **c) En présence d'acides aminés**

En présence d'acides aminés, ceux-ci se fixent à Ssy1p provoquant un changement conformationnel au niveau de sa partie N-terminale. Ceci provoque la phosphorylation de Ptr3p par les caséine kinases Yck1/2. Ceci induit alors l'activation de la protéase Ssy5p. Egalement, Abdel-Sater F. *et al.* ont montré que cette même caséine kinase Yck1 pouvait phosphoryler Stp1p afin de favoriser le mécanisme d'activation de ce facteur de transcription. Par la suite, Ssy5p va cliver les précurseurs des facteurs de transcription Stp1p et Spt2p au niveau de leurs parties N-terminales. Stp1/2p étant ainsi activés et libérés, ils pourront alors migrer dans le noyau et induire la transcription des gènes codant pour les perméases dépendantes de SPS, nécessaires à l'absorption des acides aminés présents dans l'environnement (Abdel-Sater et al, 2004) (Liu et al, 2008) (Hundal & Taylor, 2009). A l'heure actuelle, aucun système homologue n'a été identifié chez les mammifères.

### **1.3. La voie TOR**

TOR (Target Of Rapamycin) est une sérine/thréonine kinase de haut poids moléculaire (280 KDa). Chez la levure, il existe 2 gènes codant pour cette kinase : TOR1 et 2. Des expériences de purification de TOR1 et TOR2 ont permis d'identifier 2 complexes distincts : TORC1 et TORC2, ayant des sensibilités différentes à la rapamycine (inhibiteur spécifique des voies TOR). Le complexe TORC1 est constitué des protéines LST8, KOG1, TCO89, et soit TOR1 soit TOR2. Le complexe TORC2 est formé des protéines AVO1, AVO2, AVO3, BIT61, LST8 et TOR2 (Wullschleger et al, 2006) (Figure 14). La sensibilité à la rapamycine dépend



**Figure 14: Rôles physiologiques et organisation des complexes TOR1 et TOR2 chez la levure.** TORC1 est responsable du contrôle temporel de la synthèse protéique. Il est activé par les nutriments, et réprimé par différents stress ou par la rapamycine. Lorsqu'il est actif, il induit la synthèse des ribosomes, les processus de traduction et l'import de nutriments et inhibe l'autophagie et la transcription spécifique du stress. TORC2 est responsable du contrôle spatial de la synthèse protéique via le remodelage du cytosquelette (d'après Wullschleger *et al.*, 2006).



de la fixation de celle-ci à la protéine chaperonne FKBP12. Or FKBP12 ne peut lier que TOR1, conférant à la rapamycine la propriété d'inhiber uniquement TORC1 (Loewith et al, 2002).

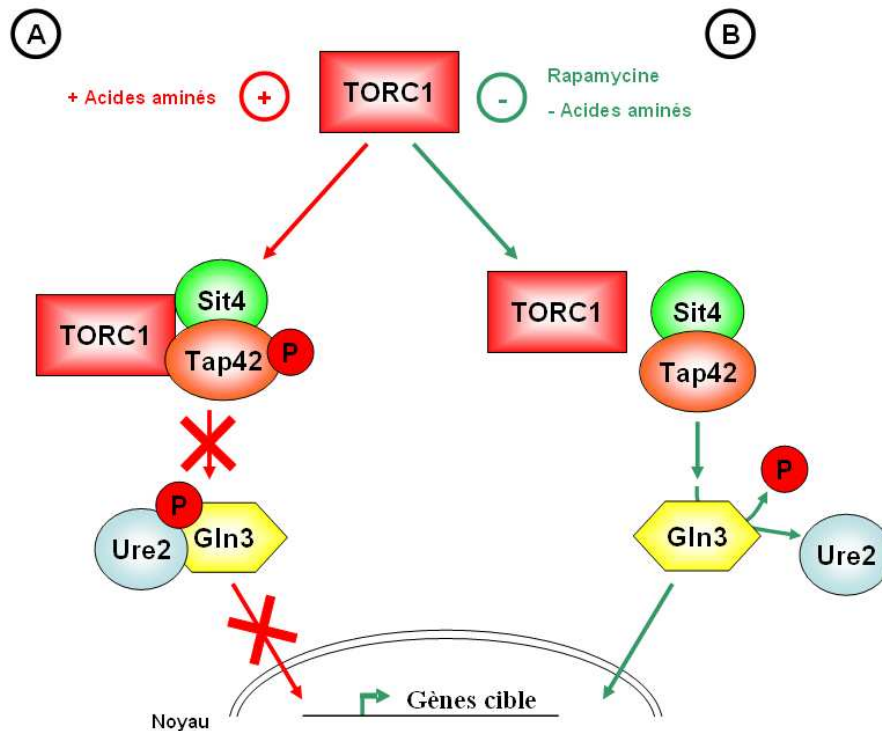
Chez la levure, l'apport de carbone et d'azote par les nutriments (notamment les acides aminés et surtout la glutamine) stimule la croissance cellulaire. La voie de signalisation TOR répond donc à la disponibilité en nutriments et en particulier aux acides aminés (Liao et al, 2008). A l'inverse, en conditions carencées en acides aminés, TOR est inhibée bloquant les cellules en phase G0 du cycle cellulaire. Ce phénotype s'accompagne d'une inhibition de la synthèse protéique, d'une activation de la macro-autophagie et de régulations transcriptionnelles spécifiques (Barbet et al, 1996).

La kinase TOR est un régulateur clé du métabolisme énergétique. Elle est notamment impliquée dans la régulation positive de mécanismes de la transcription, la traduction, la biogénèse de ribosomes ou encore dans l'organisation de l'actine. A l'inverse, elle régule négativement les processus cataboliques comme la dégradation d'ARN et de protéines, ainsi que l'autophagie (De Virgilio & Loewith, 2006). TOR réprime l'expression des gènes impliqués dans la réponse à la carence en acides aminés. En revanche, elle active l'expression des gènes des protéines ribosomales (Zaragoza et al, 1998).

La voie de signalisation impliquée dans la répression des gènes du catabolisme de l'azote, qui font partie des gènes d'adaptation à la carence en acides aminés, a été décrite (Cardenas et al, 1999) (Hardwick et al, 1999). L'expression de ces gènes est régulée de manière positive par le facteur de transcription Gln3. La régulation de ce facteur se fait par phosphorylations inhibitrices ; plus son niveau de phosphorylation est fort, moins son activité transactivatrice est élevée.

Lorsque les cellules se développent dans un milieu riche en sources azotées (comme la glutamine), TORC1 est actif et le niveau de phosphorylation de Gln3 est élevé (Figure 15). L'augmentation de l'activité kinase de TORC1 va provoquer le recrutement et la phosphorylation de la protéine Tap42, induisant sa liaison avec la phosphatase Sit4 (aussi appelée PP2A). Ceci va avoir pour conséquence la séquestration de Sit4 dans un complexe TORC1/Sit4/Tap42, inhibant son activité phosphatase vis-à-vis de Gln3. Le niveau de phosphorylation de Gln3 restant élevé, celui-ci est séquestré au niveau cytoplasmique par la protéine Ure2 et ne peut donc pas induire ses gènes cibles.

En revanche, lorsque les levures sont dans un milieu pauvre en source azotée, l'inactivation de TORC1 par la carence en acides aminés entraîne la libération du complexe Tap42/Sit4. Celui-ci va déphosphoryler Gln3 entraînant sa dissociation de Ure2 et sa translocation dans le



**Figure 15: Régulation de la transcription par TOR en fonction du statut en nutriments.** **A)** En présence d'acides aminés, TORC1 activé va phosphoryler TAP42 qui va séquestrer Sit4. Ceci empêche Sit4 de déphosphoryler Gln3. Le niveau élevé de phosphorylation de Gln3 favorise sa liaison avec Ure2 et ainsi inhibe sa translocation au niveau nucléaire. **B)** En absence d'acides aminés ou en présence de rapamycine, le complexe Tap42/Sit4 ne sera pas recruté par TORC1 (inactif). De ce fait, Sit4 va déphosphoryler Gln3 provoquant la libération de Gln3 vis-à-vis de Ure2 et l'activation de la transcription de ses gènes cibles. (d'après Tate *et al.*, 2008)

noyau. Ce facteur pourra ainsi activer les gènes cibles requis pour l'utilisation de sources azotées secondaires (Tate et al, 2009). TOR régule également de très nombreux autres facteurs de transcription de manière similaire (pour revue : (De Virgilio & Loewith, 2006)). Enfin, plusieurs travaux évoquent une liaison entre les voies TOR et GCN2. Ainsi TOR phosphoryle la sérine 477 de GCN2, phosphorylation qui est inhibée par un traitement à la rapamycine. Toutefois, la fonction de cette phosphorylation n'est pas clairement établie. De plus, ce site n'est pas conservé chez le mammifère (Cherkasova & Hinnebusch, 2003) (Hinnebusch, 2005).

## **2. Contrôle spécifique : la voie IPM-Leu3P**

Certaines enzymes impliquées dans les voies de biosynthèse de quelques acides aminés peuvent être soumises à un contrôle spécifique par leur produit terminal ou par un métabolite intermédiaire. Par exemple, chez la levure, la biosynthèse de la leucine est réalisée en 4 étapes (Figure 16) :

1-La conjugaison de l' $\alpha$ -ketoisovalarate avec de l'acetyl-CoA, assuré par une IPM synthase (ou Leu4). Ceci va former de l' $\alpha$ -isopropylmalate (ou  $\alpha$ -IPM).

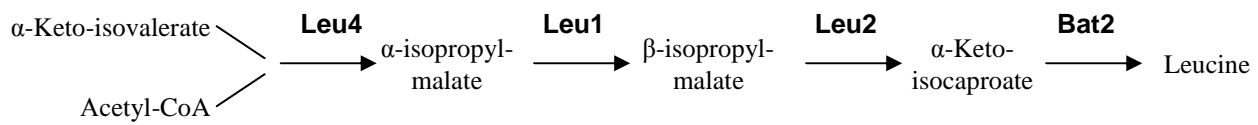
2-La conversion de l' $\alpha$ -IPM en  $\beta$ -IPM par une IPM isomérase (ou Leu1).

3-La conversion du  $\beta$ -IPM en  $\alpha$ -ketoisocaproate par une IPM déshydrogénase (ou Leu2).

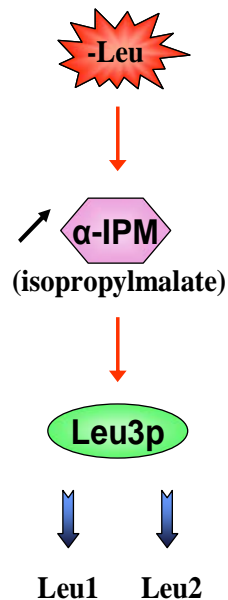
4-La transamination du  $\alpha$ -ketoisocaproate par une amino-acid aminotransférase (BAT2) pour former la leucine (Kohlhaw, 2003; Vijay R. Baichwal, 1983) (Yoshimoto et al, 2002).

Certaines de ces enzymes sont soumises à un contrôle spécifique par la leucine (produit final) ou par un métabolite intermédiaire. C'est le cas pour la première enzyme de la biosynthèse de la leucine, Leu4. Son expression est inhibée via un rétrocontrôle par la leucine. Ainsi, une forte concentration en cet acide aminé conduit à un niveau faible d' $\alpha$ -IPM et inversement, une carence en leucine augmente le niveau d'  $\alpha$ -IPM. Cet intermédiaire va ainsi jouer le rôle de senseur de la disponibilité en leucine (Sze et al, 1992).

Egalement, Leu1 et Leu2 sont deux enzymes contrôlées transcriptionnellement par un facteur de transcription commun : Leu3p (Figure 17). Ce facteur est constitutivement fixé à la région promotrice des gènes cibles. Ainsi, lors de faibles concentrations en leucine, le taux intracellulaire d' $\alpha$ -IPM, précurseur de la synthèse de leucine, augmente. Ceci va induire un changement de conformation de Leu3p, démasquant son domaine d'activation activant alors



**Figure 16: Schéma de la biosynthèse de la leucine chez la levure**



**Figure 17 : Activation de la voie IPM-Leu3p chez la levure.** Une carence en leucine induit l'augmentation de la concentration d' α-isopropylmalate dans la cellule, activant le facteur de transcription Leu3p. Celui-ci va alors induire la transcription des gènes Leu1 et Leu2 impliqués dans la voie de biosynthèse de la leucine.

la transcription des gènes *LEU1* et *LEU2*. En conséquence, l'accumulation de ces deux enzymes stimulera la synthèse de la leucine à partir d' $\alpha$ -IPM pour palier à la carence (Kirkpatrick & Schimmel, 1995) (Sze et al, 1992).

Cette voie de signalisation est conservée chez les plantes vertes, les eubactéries, archaebactéries et les champignons. Cependant, il n'y a pas d'équivalent décrit chez les mammifères (Kohlhaw, 2003).

# Chapitre III. Régulation de l'expression des gènes par les acides aminés chez les mammifères

Chez les mammifères, la variation de concentrations en acides aminés est également responsable de la régulation de l'expression des gènes. Différentes études ont montré qu'une carence en un ou plusieurs acides aminés était capable d'augmenter l'expression de certains gènes. Cette observation, décrite pour la première fois par Gazzola *et al.* en 1981, concernait l'augmentation de l'activité de transporteurs d'acides aminés SNAT2 (système A), conséquence selon l'hypothèse des auteurs d'une augmentation des transcrits suite à la carence (Gazzola et al, 1981). La première confirmation d'un tel mécanisme a été apportée dix ans plus tard par Gong *et al.*, qui ont pu démontrer que la transcription du gène *Asparagine Synthase* (ASNS) et la stabilité de son transcrit étaient augmentées lors d'une carence en acides aminés (Gong et al, 1991). En 1993, Straus *et al.* ont mis en évidence une régulation similaire pour le gène *Insulin-like Growth Factor Binding Protein 1* (IGFBP-1) (Straus et al, 1993), puis l'année suivante cette même équipe a identifié six nouveaux gènes surexprimés par la carence en acides aminés, dans lesquels le gène *C/EBP Homologous Protein* (CHOP ou *GADD153*) était le plus induit (Marten et al, 1994). Par la suite, des expériences de transcriptomique à haut débit (puces à ADN) ont montré que de nombreux gènes pouvaient répondre à une variation de la concentration en acides aminés. Ainsi Peng *et al.* (Peng et al, 2002) ont hybridé une puce Affymetrix de 11.000 gènes avec des ARNm de lymphomes humain. La grande majorité des gènes réprimés par la carence en leucine (80%) le sont également par la carence en glutamine. En revanche, seulement 40% des gènes réprimés par la glutamine le sont également par la leucine. Ce résultat illustre le fait qu'il existe différents types de régulation qui ne sont pas partagés par tous les acides aminés.

L'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans le contrôle de l'expression de ces gènes a permis de déterminer trois grands niveaux régulation mis en jeu au cours d'une carence en acides aminés : la régulation de la traduction des ARNm, la régulation de la stabilité des ARNm et enfin la régulation de la transcription des gènes. La régulation de la traduction par les acides aminés est un phénomène relativement bien décrit, par contre peu de données existent sur la régulation de la stabilité des ARNm par les acides aminés. Enfin, concernant la

régulation de la transcription, des études de plus en plus nombreuses permettent de caractériser les mécanismes impliqués.

## **1. Régulation de la traduction des ARNm par la disponibilité en acides aminés**

Chez les mammifères, la disponibilité en acides aminés régule la traduction à deux niveaux : i) un niveau général (concernant la majorité des ARNm en traduction) comprenant la régulation de l'initiation et de l'élongation, ii) un niveau spécifique permettant de traduire certains ARNm dans un contexte de limitation en acides aminés.

### **1.1. Régulation générale de la traduction par la disponibilité en acides aminés**

La traduction des ARNm peut être régulée à deux grands niveaux selon la disponibilité en acides aminés : l'initiation et l'élongation. Ces deux niveaux de régulation seront présentés ainsi que deux cas particuliers : CAT-1 et ATF3 dont les traductions font intervenir des mécanismes spécifiques.

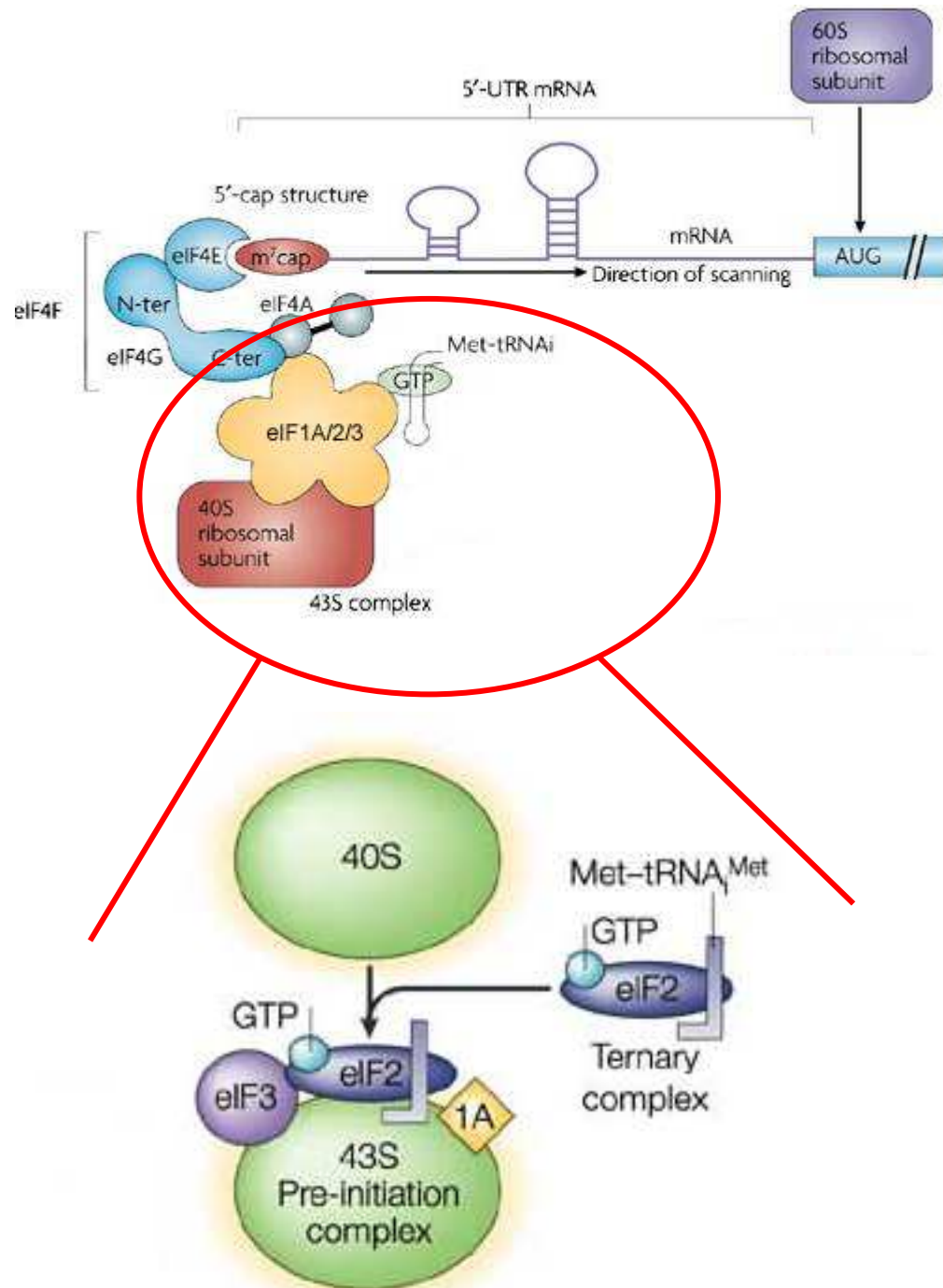
#### **a) Régulation de l'étape d'initiation**

Chez les mammifères, l'initiation de la traduction est un mécanisme identique à celui de la levure. Dans ce processus, la fixation du complexe 43S (petite sous unité du ribosome 40S + eIF1A+eIF3+complexe ternaire eIF2-GTP-Met-ARNt<sup>met</sup>) à l'ARNm est une étape importante (Figure 18) (Balvay et al, 2007; Klann & Dever, 2004). Comme abordé chez *S. cerevisiae*, l'étape limitante du rechargement en GTP d'eIF2 est un point de contrôle important, conservé chez le mammifère. De plus, un second niveau de régulation de l'initiation par la disponibilité en acides aminés a lieu lors de l'étape de fixation du complexe 43S à l'ARNm.

#### **Au niveau de la formation du complexe 43S**

Au cours d'une carence en acides aminés, la régulation de la formation du complexe 43S sera inhibée par la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ , empêchant ainsi la recharge d'eIF2 $\alpha$ -GDP en eIF2 $\alpha$ -GTP. Ceci induit un blocage de la traduction en phase d'initiation (Kilberg et al, 2009).

Contrairement à ce qui est décrit chez la levure, quatre protéines peuvent phosphoryler eIF2 $\alpha$  sur la sérine 51 chez les mammifères. Ces kinases sont PKR, PERK, HRI et mGCN2. Bien



**Figure 18: Assemblage du complexe de pré-initiation 43S lors de l'initiation de la traduction.** Chez les mammifères, comme chez la levure, la sous-unité du ribosome 40S va s'associer avec les facteurs eIF1A, eIF3 et le complexe ternaire composé de eIF2/GTP/Met-ARNt<sup>met</sup>. Ceci donne un complexe de pré-initiation 43S capable de lier l'ARNm au niveau de la cap 5' par l'intermédiaire du complexe eIF4F (extrait de Balvay L. *et al.*, 2007; Klann E.K. et Dever T.E., 2004).



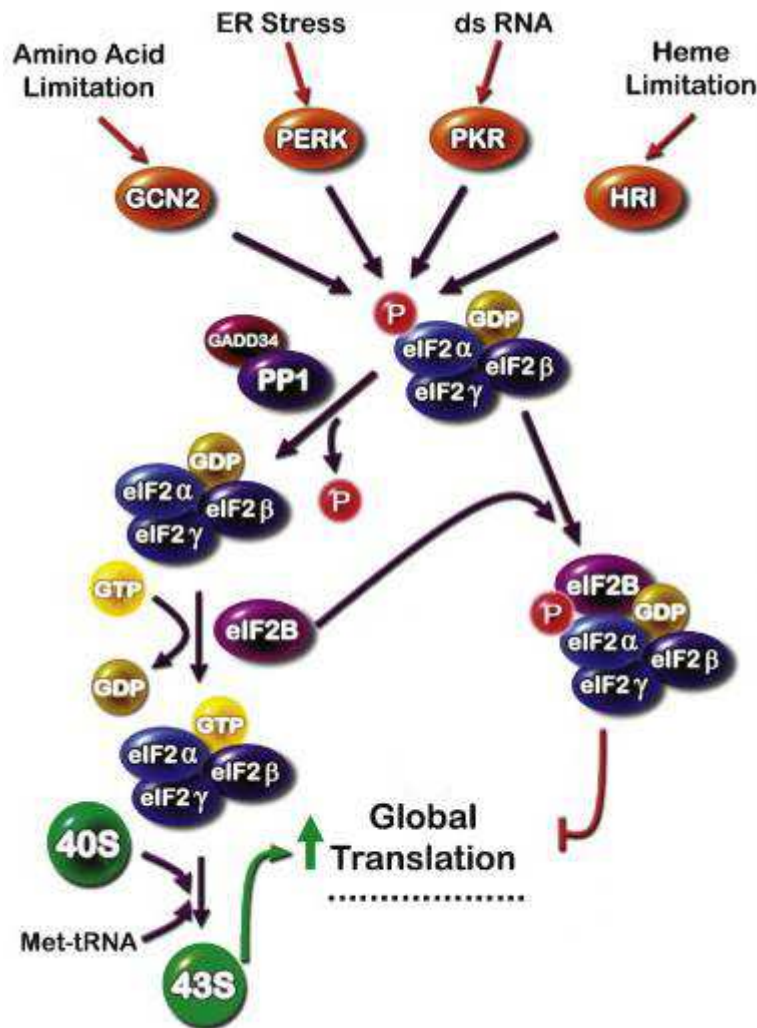
qu'elles contiennent toutes un domaine régulateur différent, elles partagent un domaine kinase conservé. Leur activation en cas de stress entraîne une baisse générale de la traduction (Figure 19)(Wek et al, 2006).

PKR (Protein kinase RNA-activated) est activée par la présence d'ARN double brins lors d'une infection virale ou par la voie de l'interféron. L'inhibition de la traduction via la phosphorylation de PKR et de eIF2 $\alpha$  serait donc un mécanisme élaboré pour arrêter la progression de l'infection virale (Garcia et al, 2007). La kinase PERK (Pancreatic Endoplasmic Reticulum eIF2 Kinase) est localisée au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique et est impliquée dans la voie de réponse au stress de celui-ci (stress ER) (Raven & Koromilas, 2008). HRI (Heme-Regulated eIF2 $\alpha$  kinase) est activée par autophosphorylation lors d'une diminution en hème, ce qui a pour conséquence d'inhiber la traduction via la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  (Chen, 2007). Enfin, la kinase mGCN2 est l'homologue chez les mammifères de GCN2. Cette kinase est, comme chez la levure, activée par l'accumulation d'ARNt non chargés, conséquence de la carence en acides aminés. Cette activation va alors provoquer la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ . Il est intéressant de signaler que la voie GCN2-eIF2 $\alpha$ , après avoir été identifiée chez la levure et les mammifères, a également été découverte chez les plantes supérieures (Zhang et al, 2003). Cette conservation au cours de l'évolution semble démontrer un rôle capital de cette voie dans l'adaptation des organismes à l'environnement.

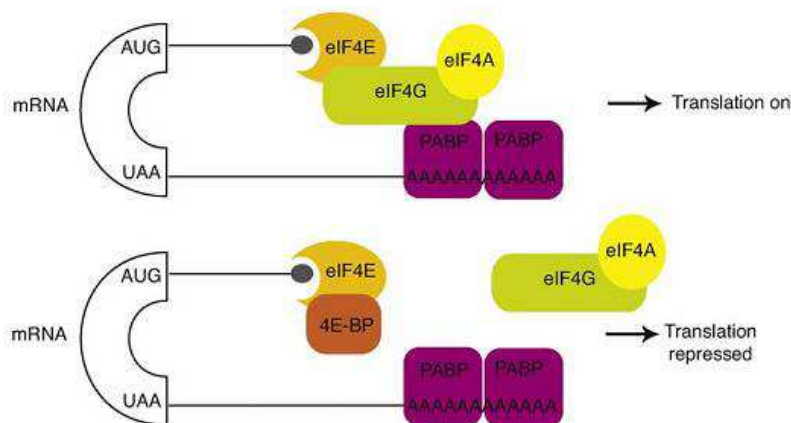
Dans tous ces cas de figure, la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  provoque l'incapacité d'eIF2B de recharger le facteur eIF2-GDP en eIF2-GTP, induisant une limitation cellulaire en complexe ternaire initiateur et donc un blocage de la traduction en phase d'initiation.

#### Au niveau de la fixation du complexe 43S

La fixation du complexe de pré-initiation 43S à l'extrémité 5' de l'ARNm est une étape cruciale de la traduction. La régulation de sa fixation fait intervenir au moins onze facteurs dont: eIF4E (protéine liant la cap m<sup>7</sup>G), eIF4G (favorisant la liaison d'eIF3 aux PolyA Binding Proteins) et eIF4A (RNA hélicase) (Figure 20) (Groppo & Richter, 2009). Ces 3 facteurs forment le complexe eIF4F, cible clé de la régulation de l'initiation de la traduction. Ce complexe se fixe au niveau de la coiffe m<sup>7</sup>G situé en 5'UTR des ARNm et recrute le complexe 43S (pour revue : (Goodfellow & Roberts, 2008)). Il est donc clair que la disponibilité des composants d'eIF4F est un point crucial pour l'initiation de la traduction. En particulier, la fonction et la disponibilité d'eIF4E sont contrôlées par deux mécanismes de régulation : i) sa phosphorylation, qui augmente son affinité pour la cap (Minich et al, 1994),



**Figure 19: Transduction des signaux de stress par la phosphorylation d'eIF2α.** Chez les mammifères, quatre kinases sont capables de phosphoryler eIF2α en réponse à divers stress. Cette phosphorylation induit la liaison de phospho-eIF2α à eIF2B aboutissant à un complexe non fonctionnel et un arrêt global de la traduction en phase d'initiation (extrait de Kilberg M.S. *et al*, 2009).



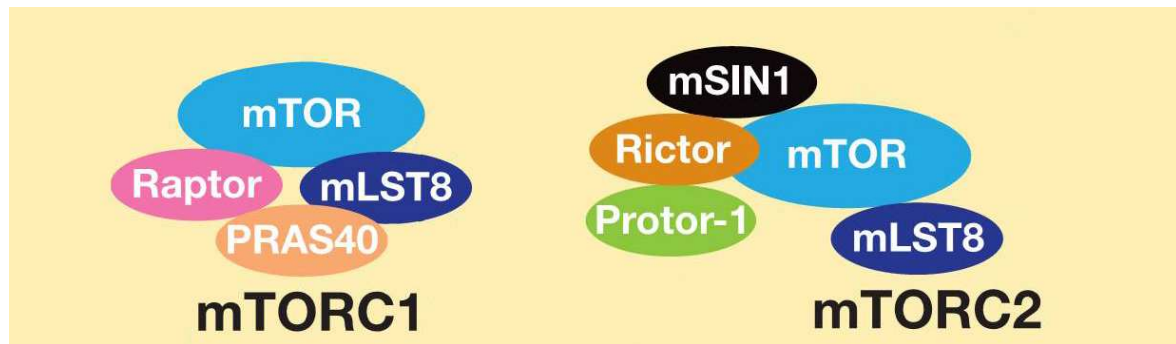
**Figure 20: Représentation schématique de la régulation de la traduction par 4EBP1.** L'initiation de la traduction nécessite la fixation des facteurs eIF4E, eIF4G et eIF4A au niveau de l'extrémité 5' de l'ARNm. Le facteur 4EBP1 peut lier eIF4E, empêchant la fixation de ce dernier aux facteurs eIF4A et G et inhibant alors la phase d'initiation (extrait de Gruppo R. et Richter J.D., 2009).

ii) sa disponibilité dépendante de la phosphorylation de 4EBP1 (eIF4E Binding Protein 1) (Figure 20).

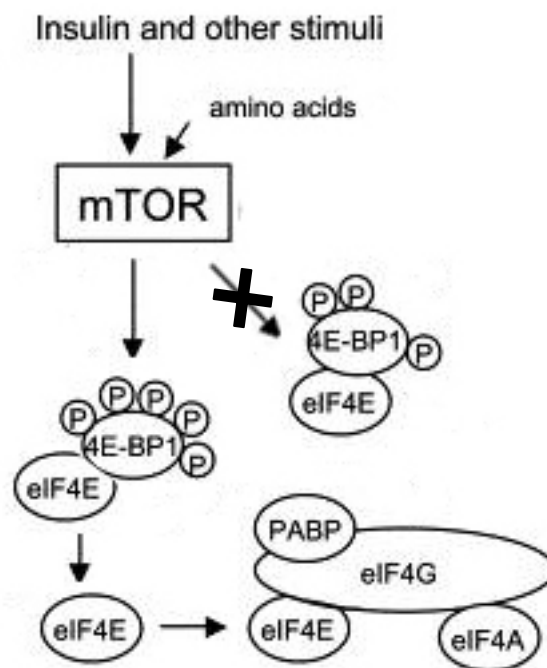
Régulation de la disponibilité d'eIF4E : ce point précis est assuré par 4EBP1 qui a la capacité de se lier à eIF4E et ainsi empêcher la formation du complexe eIF4F. La liaison d'eIF4E à 4EBP1 dépend du niveau de phosphorylation de 4EBP1. Ainsi, son état hyperphosphorylé favorise la libération d'eIF4E et donc l'initiation de la traduction (Gingras et al, 2001). La supplémentation en acides aminés, en particulier la leucine, augmente le niveau de phosphorylation de 4EBP1 et donc stimule la synthèse protéique (Hara et al, 1998). Inversement, la carence mais également le traitement à la rapamycine conduisent à l'hypophosphorylation de 4EBP1 et donc favorisent la séquestration de eIF4E. Ce dernier résultat indique que ce mécanisme est un processus de régulation analogue à celui de TOR chez la levure.

Régulation du niveau de phosphorylation de 4EBP1 : la régulation de la phosphorylation de 4EBP1 se fait par l'intermédiaire d'un homologue chez les mammifères de la kinase TOR: mTOR. Contrairement à la levure, chez les eucaryotes supérieurs, il n'existe qu'un seul gène codant pour cette protéine. mTOR peut former deux complexes distincts : mTORC1 et mTORC2 (Figure 21). mTORC2 (mTOR Complex 2) est constitué de la protéine mTOR, de mLST8, de mSIN1, de Protor-1 et de Rictor (Laplanche & Sabatini, 2009). Si les fonctions de ce complexe restent encore indéterminées, mTORC2 a été décrit comme régulateur du contrôle spatial de la croissance cellulaire, notamment en contrôlant la formation du cytosquelette. Ce complexe n'est pas sensible aux variations énergétiques et nutritionnelles de la cellule. Récemment, l'équipe de D.M. Sabatini a démontré que mTORC2 peut phosphoryler AKT sur la sérine 473, site crucial pour une activation maximale de cette protéine, et la PKC $\alpha$  sur un motif similaire à celui d'AKT en réponse à l'insuline. Cependant, on ne connaît pas le mécanisme d'activation de mTORC2 par les facteurs de croissance (Alessi et al, 2009; Huang & Manning, 2009) (Ikenoue et al, 2008).

mTORC1 (mTOR Complex 1) fonctionne comme l'intégrateur des signaux de disponibilité des nutriments, de l'énergie ou du potentiel redox et contrôle la synthèse protéique. Ce complexe est constitué des protéines mTOR, Raptor, PRAS40 et mLST8. L'activité de ce complexe est stimulée par l'insuline, les facteurs de croissance, le stress oxydatif et les acides aminés (en particulier la leucine) (Reiling & Sabatini, 2006). Après activation, mTORC1 va phosphoryler 4EBP1, inhiber la séquestration d'eIF4E et donc promouvoir l'initiation de la traduction (Figure 22).



**Figure 21: Représentation des complexes mTORC1 et mTORC2.** mTORC1 est constitué des protéines mTOR, Raptor, PRAS40, mLST8. mTORC2 est composé de mTOR, mLST8, Protor-1, Rictor et mSIN1 (d'après de Laplante M. et Sabatini D.M., 2009).



**Figure 22: Régulation de la phosphorylation de 4EBP1 par mTOR.** L'activation de mTOR par les facteurs de croissance ou la supplémentation en acides aminés, induit la phosphorylation du facteur 4EBP1. Ceci provoque la levée de la séquestration de 4EBP1 par eIF4E et donc une stimulation de l'initiation de la traduction (d'après Proud C.G., 2004).

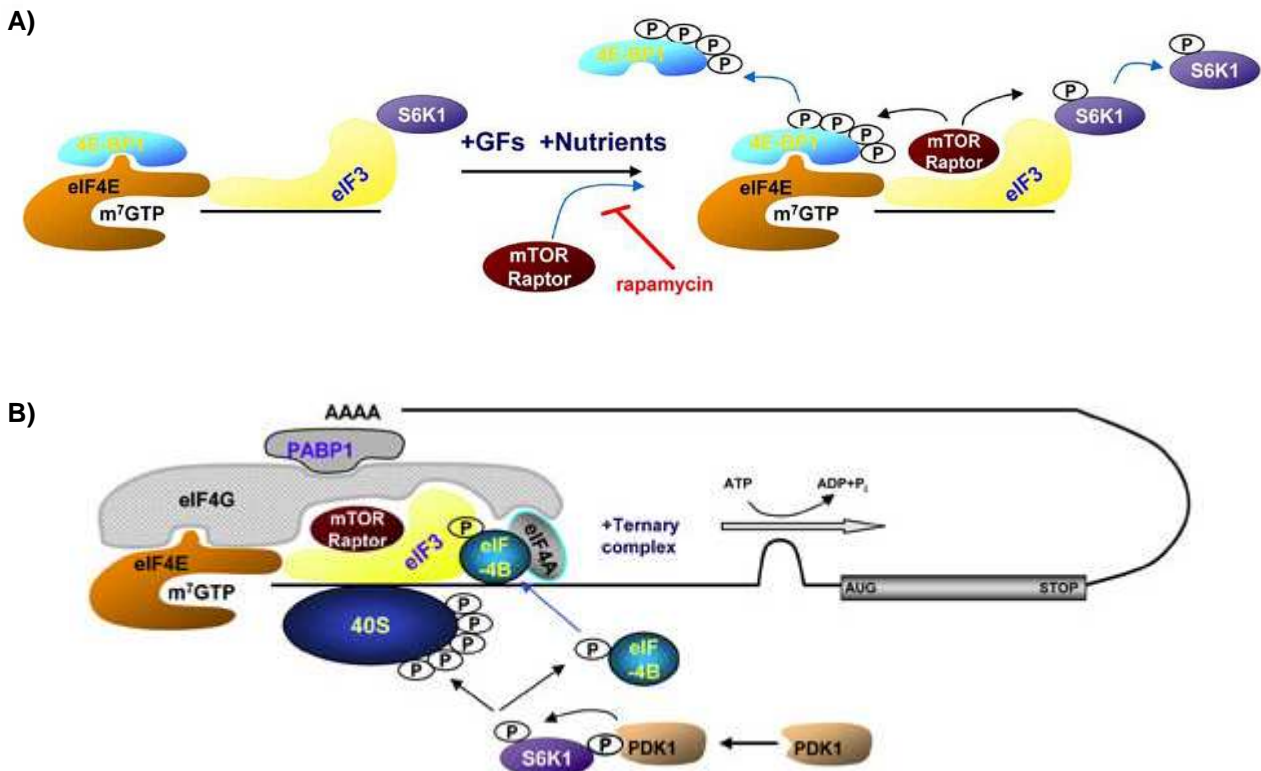
A l'inverse, mTORC1 est inhibé par la carence en nutriments ou en facteurs de croissance. mTORC1 est également le seul complexe sensible à une exposition aigüe à la rapamycine. Cette inhibition va abaisser le niveau de phosphorylation de 4EBP1 et donc inhiber l'initiation de la traduction (Beevers et al, 2009; Kim et al, 2002).

#### *Au niveau de la régulation de l'activité du facteur eIF4A*

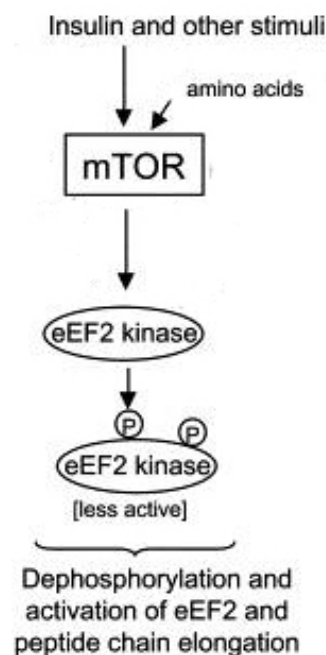
L'initiation de la traduction nécessite également une activité hélicase au sein du complexe eIF4F. Celle-ci est portée par le facteur eIF4A et nécessite l'utilisation d'ATP. Le rechargement d'eIF4A est assuré par le facteur eIF4B (Shahbazian et al, 2006). Ce dernier est activé par phosphorylation au niveau de la sérine 422 par la kinase S6K1. L'activité enzymatique de S6K1 est régulée principalement par son degré de phosphorylation et son affinité pour le facteur eIF3. A l'état basal, S6K1 est séquestré par eIF3. Or les acides aminés peuvent réguler l'interaction eIF3/S6K1 par l'intermédiaire de mTORC1. En présence d'une forte concentration de ces nutriments, mTORC1 va être recruté au niveau d'eIF3 et va phosphoryler S6K1. Celle-ci sera libérée d'eIF3 et va pouvoir être activée par une seconde kinase : PDK1 (Figure 23). S6K1 va alors phosphoryler le facteur eIF4B et promouvoir l'activité hélicase d'eIF4A. Cette kinase peut également phosphoryler la protéine ribosomale S6 qui va permettre d'accélérer l'étape d'initiation. A l'inverse, une carence en acides aminés inhibe mTORC1 et donc la phosphorylation d'eIF4B par S6K1. Ceci empêche le rechargement d'eIF4A en ATP et provoque l'arrêt de la traduction (Holz et al, 2005) (Ma & Blenis, 2009).

#### **b) Régulation de l'étape d'élongation par le facteur d'élongation 2 (eEF2)**

L'élongation est le processus au cours duquel les acides aminés s'associent un à un pour former une chaîne polypeptidique. A chaque étape d'incorporation d'un résidu, cette opération s'accompagne d'un déplacement relatif du ribosome sur l'ARNm appelé « translocation ». eEF2 est le facteur chargé de fournir le GTP nécessaire à la translocation du ribosome de trois nucléotides sur l'ARNm après l'ajout de chaque acide aminé dans la séquence protéique en cours de synthèse. eEF2 est régulé par phosphorylation inhibitrice. Ainsi, la phosphorylation d'eEF2 induit une inhibition de l'élongation protéique. La kinase responsable de cette phosphorylation est eEF2K. Or, eEF2K est aussi une cible de la kinase S6K1. De la même manière qu'eEF2, la phosphorylation d'eEF2K est inhibitrice. Ainsi, l'activation de mTORC1 (par exemple par une supplémentation en acides aminés) induit la phosphorylation inhibitrice d'eEF2K (Figure 24). Il y a alors une levée de l'inhibition d'eEF2



**Figure 23: Régulation de la phosphorylation d'eIF4B et de la protéine ribosomale S6 par la voie mTORC1/S6K1.** A) L'activation de mTORC1 par les facteurs de croissance ou la supplémentation en acides aminés, induit son recrutement au niveau du complexe eIF3/S6K1. Cette activation provoque la phosphorylation par mTOR de 4EBP1 mais également de S6K1 et sa libération de eIF3. B) Elle va alors être activée par la kinase PDK1. S6K1 va à son tour phosphoryler la protéine ribosomale S6 (au sein du 40S) mais également eIF4B afin de stimuler l'activité hélicase de eIF4A (extrait de Holz M.K. *et al.*, 2005).



**Figure 24: Régulation du facteur d'élongation eEF2 par mTOR.** L'activation de mTOR par les facteurs de croissance ou la supplémentation en acides aminés, induit la phosphorylation d'eEF2K. Cette phosphorylation inhibe l'activité kinase de cette dernière et provoque une hypophosphorylation de son substrat eEF2 et donc une stimulation de l'élongation (d'après Proud C.G., 2004).

et l'élongation est accélérée (Proud, 2006). A l'inverse, une carence en acides aminés inhibe mTOR et donc également l'activité de S6K1. La kinase eEF2K n'étant pas phosphorylée, elle sera active et pourra, à son tour, phosphoryler le facteur d'élongation eEF2. Cette modification d'eEF2 inhibe sa fixation au ribosome. L'activité d'échange de GTP est donc fortement abaissée, réduisant la vitesse d'élongation. Ceci permet notamment à la cellule d'économiser les stocks d'acides aminés libres lors de ce stress nutritionnel (Proud, 2004) (Smith & Proud, 2008).

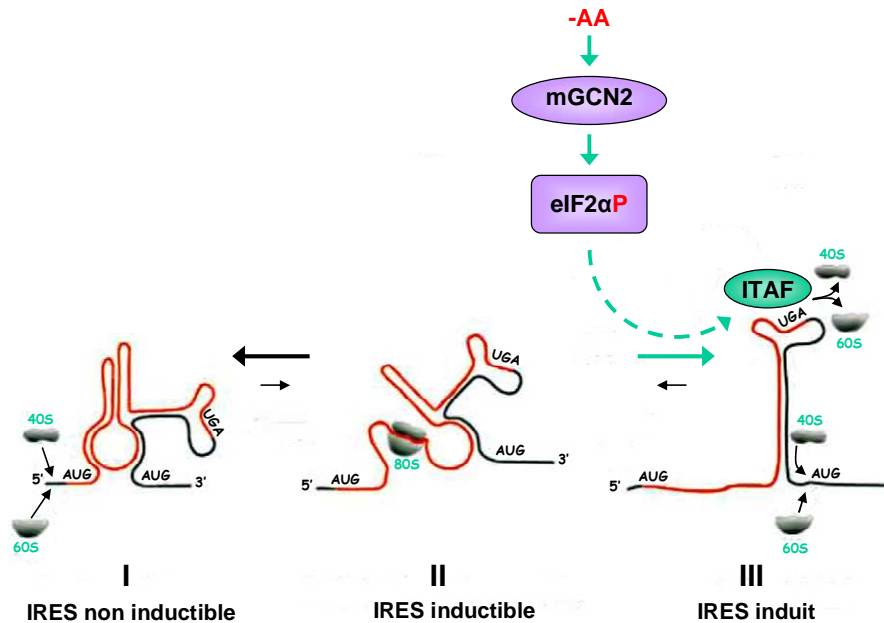
## **1.2. Régulation spécifique de la traduction au cours d'une carence en acides aminés**

Au cours d'une carence en acides aminés, le niveau de synthèse protéique global diminue. Cependant, l'expression de certaines protéines spécifiques est maintenue, voire même augmentée. Cette régulation se fait, notamment, au niveau de la traduction de leurs messagers. Nous allons ici détailler la régulation spécifique de la traduction des protéines CAT-1 et ATF4 durant une carence en acides aminés.

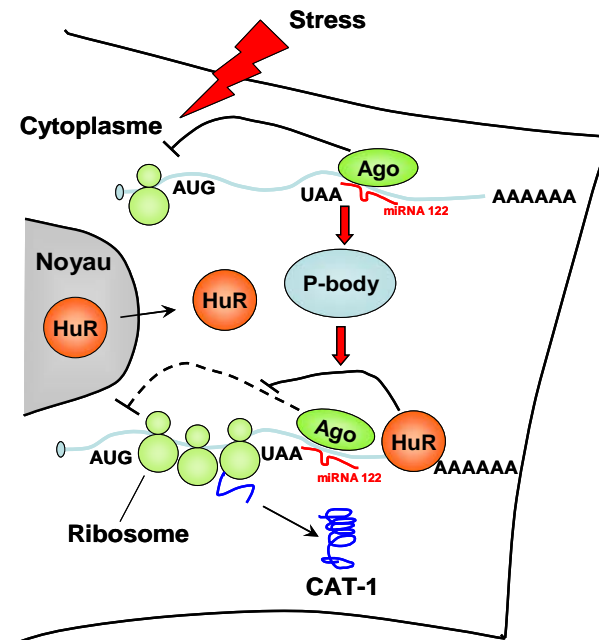
### **a) Régulation de la traduction de Cationic Amino acids Transporter 1 (CAT-1)**

CAT-1 est un transporteur d'acides aminés Na<sup>+</sup>-indépendant. Il transporte de manière pH-indépendante la lysine, l'arginine et l'ornithine. En 1997, il a été montré que le niveau d'expression de la protéine CAT-1 ainsi que le transport de l'arginine sont induits par une carence en acides aminés (Hyatt et al, 1997). L'augmentation de l'expression de CAT-1 fait intervenir à la fois la régulation de sa transcription, de la stabilité et de la traduction de son messenger.

La régulation de la traduction de l'ARNm de CAT-1 au cours d'une carence en acides aminés implique une séquence IRES (Internal Ribosome Entry Site) découverte dans la région 5'UTR de cet ARN (Fernandez et al, 2001). Cette séquence possède également un uORF (upstream Open Reading Frame) codant pour une petite séquence peptidique de 48 acides aminés. Lors d'une carence, la traduction de l'uORF provoque une modification de la structure de l'IRES, permettant au ribosome de se lier directement au codon initiateur sans avoir besoin du complexe eIF4F (Figure 25)(Yaman et al, 2003) (Fernandez et al, 2002). Par ailleurs, Fernandez *et al.* (Fernandez et al, 2002) ont montré que la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  était également indispensable à la traduction de CAT-1, soit par la kinase mGCN2 (carence en acides aminés), soit par PERK (carence en glucose). Cette phosphorylation permet la synthèse



**Figure 25: Régulation IRES-dépendante de la traduction de l'ARNm de CAT-1.** I) En l'absence de la traduction de l'uORF, la traduction de CAT-1 est fortement réprimée par la structure de l'IRES. II) Conformation intermédiaire: l'uORF est traduit, ouvrant partiellement l'IRES. III). Lors d'une carence en acides aminés, les ITAFs (IRES Trans-Activating Factors) se fixent et stabilisent à l'IRES permettant la traduction de l'ARNm de CAT-1 (d'après Yaman *et al.*, 2003).



**Figure 26: Régulation de la traduction de l'ARNm de CAT-1 par les miRNA dans le foie.** En condition normale, le miRNA 122 est lié à ses sites spécifiques sur l'ARNm de CAT-1 et réprime sa traduction via des protéines Argonautes (Ago). Ceci provoque la sequestration des messagers Cat-1 dans des vacuoles impliqués dans la dégradation des ARNm et l'inhibition de la traduction : les P-Bodies. Au cours d'un stress, la protéine HuR est libérée du noyau vers le cytoplasme. Elle se lie alors à la région 3'UTR de l'ARNm de CAT-1 et l'évacue des P-bodies vers les polysomes, impliqués dans la traduction des ARNm. HuR va alors inhiber l'activité de Ago, permettant à la protéine CAT-1 d'être traduite (d'après Pillai *et al.*, 2007).



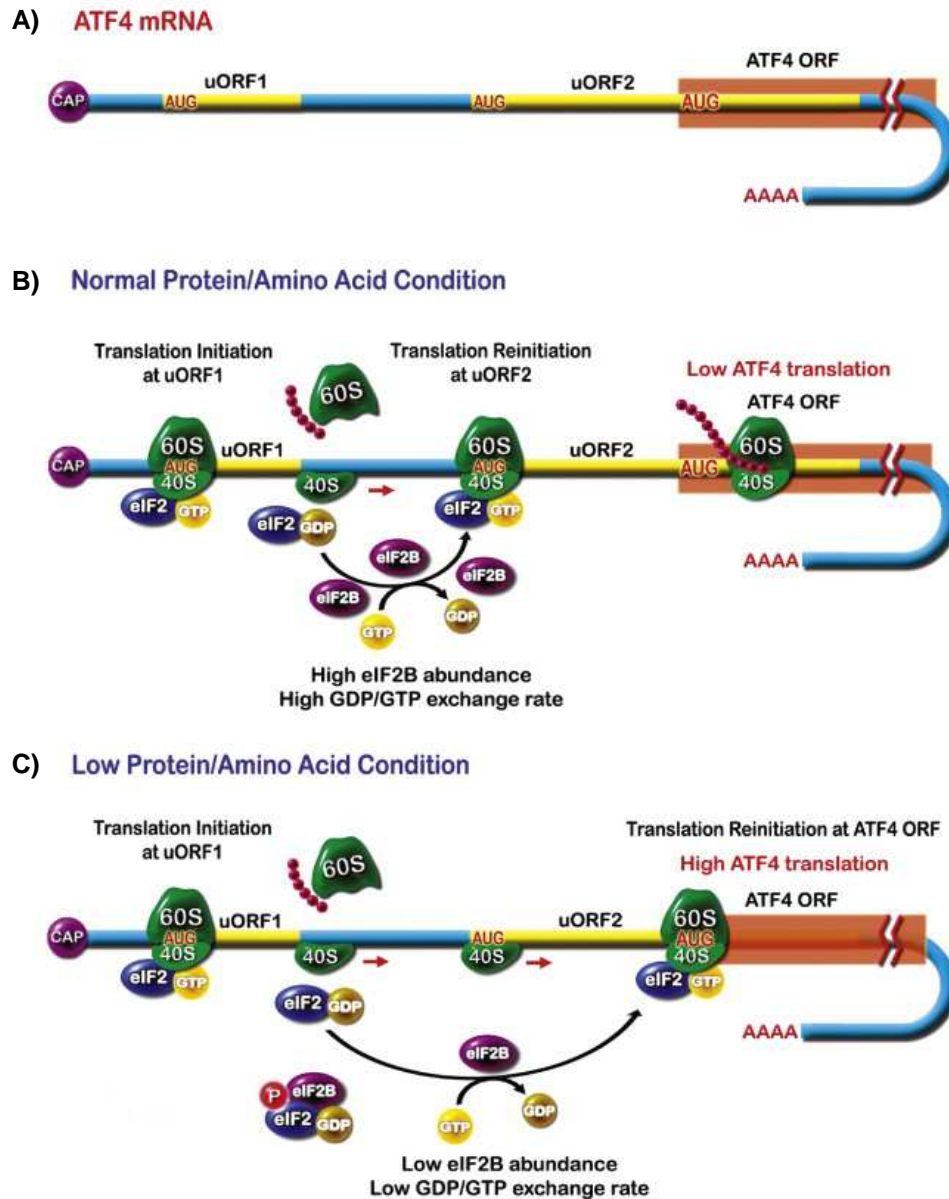
de protéines ITAF (IRES TransActing Factors), qui stabiliseraient la structure en position ouverte, et permettraient ainsi la traduction IRES-dépendante (Fernandez et al, 2003; Fernandez et al, 2001).

Récemment, un nouveau mécanisme de répression de la traduction de CAT-1 a été identifié, faisant intervenir un microRNA (miRNA) (Figure 26). Plusieurs sites potentiels de fixation pour miR-122, un miRNA spécifique du foie, ont été identifiés dans la séquence 3' non traduite de l'ARNm de CAT-1. Chang *et al.* (Chang et al, 2004) ont montré que ces sites sont parfaitement actifs, permettant de réprimer la traduction de CAT-1 en séquestrant l'ARNm dans les corps P (P-bodies), des vacuoles impliquées dans la dégradation des ARNm et l'inhibition de leur traduction en condition basale. Au cours d'une carence en acides aminés, la protéine HuR est transloquée dans le cytoplasme et active la traduction de CAT-1 en déplaçant l'ARNm vers les polysomes (Bhattacharyya et al, 2006).

#### **b) Régulation de la traduction de Activating Transcription Factor 4 (ATF4)**

ATF4 est l'homologue chez les mammifères de GCN4 (levure). Ces facteurs possèdent donc une régulation traductionnelle pratiquement identique. L'expression d'ATF4 est augmentée lors d'une carence en acides aminés. Comme GCN4, il aura pour rôle d'induire la transcription de nombreux gènes en réponse à cette carence tels: *ATF3* et *CHOP*, codants pour des facteurs de transcription (Pan et al, 2007) (Fawcett et al, 1999) ou encore *Asparagine Synthétase*, un gène codant pour une protéine impliquée dans la synthèse d'acides aminés (Siu et al, 2002).

Des uORFs ont été identifiés dans la partie 5' non traduite d'ATF4 qui, à l'instar de GCN4, lui confère la capacité à être traduit malgré l'inhibition globale de la traduction (Figure 27). Harding *et al.* (Harding et al, 2003) ont montré qu'un traitement à la tunicamycine ou une carence en leucine entraînait l'activation de PERK ou de mGCN2, induisant l'augmentation de la traduction d'ATF4 (Harding et al, 2000). Au moyen de cellules invalidées pour le gène ATF4 (cellules ATF4<sup>-/-</sup>), la même équipe a montré qu'ATF4 régule également l'expression d'un grand nombre de gènes au cours d'un stress du réticulum endoplasmique. Dans ce cas, une partie des gènes régulés par ATF4 sont impliqués dans le métabolisme des acides aminés et la protection contre le stress oxydant. La voie de signalisation mGCN2/ATF4 présente donc beaucoup de similitudes avec la voie GCN2/GCN4 de la levure, et sera développée plus tard.



**Figure 27: Régulation de la traduction d'ATF4 en réponse à la carence en acides aminés.**

**A)** La structure de l'ARNm d'ATF4 chez l'homme contient deux uORF. L'uORF2 chevauche la séquence codante d'ATF4. **B)** En condition de concentration normale en protéines et/ou en acides aminés, le scan de l'ARNm opéré par les ribosomes provoque l'initiation de la traduction d'ATF4 au niveau de l'uORF1. Après avoir traduit cet uORF1, la ré-initiation de la traduction, possible par un haut niveau de eIF2-GTP, va se faire au niveau de l'uORF2. La synthèse d'ATF4 sera alors faible. **C)** Lors d'une faible concentration en acides aminés ou en protéine, la phosphorylation d'eIF2 va diminuer fortement la réinitiation de la traduction après l'uORF1. La sous unité 40S du ribosome va alors continuer de balayer l'ARNm. La probabilité de réinitier la traduction avant d'atteindre l'uORF2 sera faible. Dans ce cas, la sous-unité 40S va passer cet uORF et parvenir à l'ORF codant pour ATF4. Ce facteur sera traduit et son expression pourra augmenter (extrait de Kilberg M.S. *et al*, 2009).

### **c) Conclusion**

Chez les mammifères, il existe deux niveaux de régulation pour l'adaptation de la cellule à la disponibilité en acides aminés. Le premier permet à la cellule d'adapter son niveau de synthèse protéique à la quantité d'acides aminés disponibles. Le deuxième entraîne une régulation spécifique de l'expression de certains gènes permettant l'adaptation cellulaire à une carence en acides aminés. Comme chez la levure, les voies mTOR et mGCN2/ATF4 sont susceptibles de réguler un grand nombre de gènes au cours de cette carence.

## **2. Régulation de la stabilité des ARNm par la disponibilité en acides aminés**

Le contenu en un ARNm est le résultat de la balance entre sa dégradation et sa production. Ainsi la durée de vie d'un messenger va conditionner la fenêtre de temps durant laquelle il va pouvoir être traduit et détermine donc le niveau d'expression d'un gène. La stabilité d'un ARNm est donc un point de régulation crucial pour la cellule et requière la mise en jeu de différents mécanismes afin de réguler finement sa quantité à un temps donné.

### **2.1. Introduction**

Chez les mammifères, la régulation de la stabilité d'un ARNm nécessite la présence de séquences régulatrices et le recrutement de facteurs protéiques à l'intérieur même des régions non-traduites (UTR : UnTranslated Region) de l'ARNm. Dans ce contexte, deux mécanismes ont largement été décrits. Le premier consiste en la préservation de la queue poly(A) située en 3'UTR de l'ARNm. Cette séquence est liée à des PABP (Poly-A Binding Protein), la protégeant ainsi des attaques des ribonucléases. Le deuxième mécanisme fait intervenir la cap en 5'UTR du messenger dont le rôle est de préserver le messenger de la dégradation par les exonucléases.

#### **a) Eléments régulateurs au niveau du 3'UTR**

Cette région est considérée comme ayant un rôle majeur dans la régulation de la dégradation d'un ARNm. Deux séquences ont largement été étudiées : l'ARE (A+U Rich Element) et l'IRE (Iron Responsive Element).

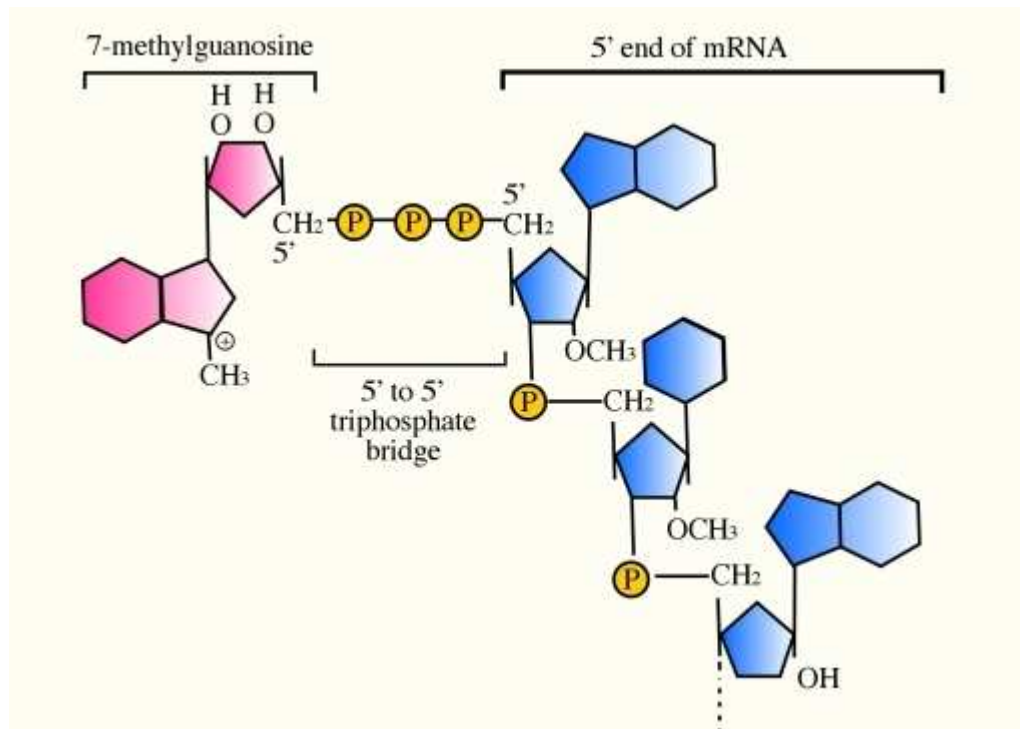
L'ARE : c'est une séquence constituée d'une répétition de bases A et U, dont le pentamère AUUUA est la séquence la plus représentative. Si la structure canonique de l'ARE reste encore à préciser, l'inclusion de cette séquence dans la région 3'UTR d'un ARNm accélère sa

dégradation. Cependant les mécanismes de dégradation dirigés par l'ARE sont très hétérogènes et dépendent fortement des facteurs protéiques liés à cette séquence. Le facteur le plus étudié intervenant dans ce processus est AUF1. Il existe 4 isoformes de cette protéine (p37, p40, p42 et p45) issus d'épissages alternatifs. Les expériences de surexpression d'AUF1 suggèrent que ce facteur est impliqué à la fois dans la dégradation et la stabilisation de l'ARNm dirigée par l'ARE. Ces fonctions peuvent différer selon le type cellulaire. Autre protéine jouant un rôle majeur dans la stabilité ARE-dépendante d'un ARNm : HuR. Cette protéine fait partie de la famille ELAV (Embryonic Lethal Abnormal Vision) RNA-binding protein comprenant HuB, HuC, HuD et HuR. Toutes ces protéines ont été décrites comme pouvant lier l'ARE et stabiliser le messenger. En revanche, contrairement à HuB/C/D dont les expressions sont restreintes au niveau cérébral, HuR est ubiquiste. La surexpression de HuR est associée à une stabilisation ARE-dépendante des messagers en bloquant la déadenylation (dégradation de la queue poly-A). Ces résultats ont été confirmés par le knock-down de HuR (siRNA), ceci accélérant la dégradation de l'ARNm (Brennan & Steitz, 2001; Mahtani et al, 2001).

L'IRE : c'est une séquence impliquée dans la régulation du métabolisme du fer et localisée dans la région 3'UTR du récepteur transferrin (TfR). Elle permet la stabilisation de ce messenger, via l'interaction avec les facteurs liant l'IRE (IREBP1/2), lorsque la concentration en fer augmente, entraînant ainsi une hausse de la captation du fer par la cellule (Guhaniyogi & Brewer, 2001).

#### **b) Eléments régulateurs au niveau du 5'UTR**

En 5', la cap prévient la dégradation du messenger de deux manières : i) la liaison particulière 5'-5' au niveau de la m<sup>7</sup>G implique une terminaison avec le coté 3' de la guanine en 5' du messenger, provoquant une résistance aux 5'exonucléases (Figure 28), ii) lors de la traduction, la cap est reconnue par les facteurs eIF4E et eIF4G, bloquant l'accès de celle-ci aux enzymes de dégradation. Les enzymes responsables de l'enlèvement de la cap (Dcp1/2) entrent en compétition avec eIF4E. Comme eIF4E et eIF4G sont liés aux protéines PABP, l'enlèvement de ces facteurs au niveau de la cap induit également une libération des PABP et donc une plus grande sensibilité de la queue poly-A aux nucléases (Newbury, 2006).



**Figure 28: Structure de la liaison particulière 5'-5' de la cap, en 5'UTR des ARN messagers.** La cap m<sup>7</sup>G est amarrée à l'ARNm par une liaison 5'-5' permettant de protéger le messenger des attaques des 5'exonucléases.

## **2.2 Exemples de régulations de stabilité d'ARNm par la disponibilité en acides aminés**

### **a) Régulation de CAT-1**

La stabilité de l'ARNm de CAT-1 est le premier mécanisme à avoir été mis en évidence dans la régulation de l'expression de *CAT-1* par la carence en un acide aminé (Aulak et al, 1999). Dans le cas de CAT-1, une séquence AU-Rich Element (ARE) particulière de 11 nucléotides a été identifiée dans la partie 3'UTR de son ARNm (Aulak et al, 1999). Cet ARE a été identifié comme responsable de la stabilisation de son messenger au cours d'une carence en acides aminés, d'où son appellation de "Nutrient Sensor ARE" (NS-ARE). Yaman *et al.* (Yaman et al, 2002) ont démontré que la protéine HuR avait la capacité de se fixer au NS-ARE durant des conditions de stress telles une irradiation aux UV ou une carence en acides aminés. Il a également été montré qu'au cours de la diminution de la concentration en acides aminés, la protéine HuR était transloquée dans le cytoplasme. HuR est donc responsable de l'augmentation de la stabilité de l'ARNm de CAT-1 au cours de ce stress (Loflin & Lever, 2001; Wang et al, 2000).

### **b) Régulation d'ATF3**

Le messenger d'ATF3 possède également une régulation post-transcriptionnel. La partie 3'UTR de cet ARNm comporte plusieurs motifs ARE (AUUUA), connues pour contrôler la balance stabilisation/dégradation du messenger. Pan *et al.* ont démontré que l'ARNm d'ATF3 était stabilisé lors d'une carence en acides aminés dans les cellules HepG2. Cette régulation passe par le recrutement de protéine HuR augmentant la stabilité du messenger. En revanche, l'interaction de l'ARNm d'ATF3 avec AUF1, protéine impliquée dans la dégradation des messagers, diminue fortement dans les mêmes conditions. L'ensemble de ces résultats démontrent que dans les situations de carences en acides aminés, la stabilité de l'ARNm d'ATF3 est augmentée alors que sa dégradation est diminuée (Pan et al, 2005).

## **3. Régulation de la transcription**

La plupart des études de la régulation de la transcription des gènes en réponse à une carence en acides aminés a porté sur l'analyse de trois gènes modèles en particulier: *Asparagine Synthétase (ASNS)*, *Activating Transcription Factor 3 (ATF3)* et *C/EBP HOmologous Protein (CHOP)*. Avant de décrire précisément les mécanismes impliqués dans la régulation de ces gènes, quelques notions de base concernant la régulation transcriptionnelle seront rappelées.

Sans vouloir être exhaustif, ce paragraphe servira surtout à replacer dans leur contexte les mécanismes et les acteurs impliqués dans la régulation générale de la transcription.

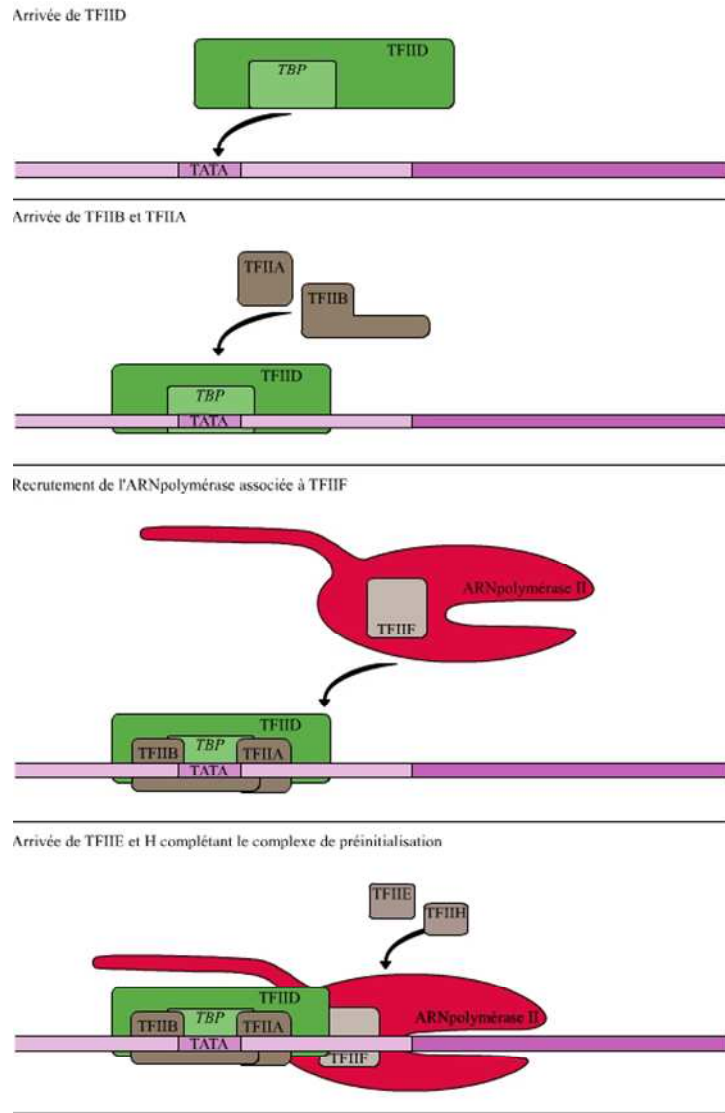
### **3.1. Mécanismes généraux de la transcription**

#### **a) Introduction**

Schématiquement, la transcription des gènes codant pour des protéines est régulée par des facteurs de transcription. Ceux-ci sont divisés en deux sous-groupes : les facteurs généraux et les facteurs spécifiques de la transcription. Le premier groupe interagit avec l'ARN polymérase II (pol II) et est constitué des 6 protéines : TFIIA, B, D, E, F et H. Ce complexe basal de la transcription permet de déterminer le site d'initiation de la synthèse des ARNm (Figure 29). Les facteurs spécifiques répondent à des stimuli externes (comme une carence nutritionnelle) et reconnaissent des séquences propres localisées dans la région promotrice de leurs gènes cibles. Selon leurs fonctions activatrices ou répressives de la transcription, ils vont interagir avec les facteurs généraux et moduler les activités enzymatiques de la machinerie transcriptionnelle. Le mécanisme général du contrôle de la transcription par les facteurs spécifiques de la transcription sera décrit ci-dessous. La régulation de la structure chromatinienne est une seconde composante importante pour la régulation de la transcription des gènes cibles et sera abordée par la suite.

#### **b) Les facteurs spécifiques de la transcription**

Les facteurs de transcription sont des protéines qui se lient à des régions spécifiques de l'ADN et dont le rôle est de réguler la transcription des gènes avoisinants, soit positivement (on parle d'activateurs transcriptionnels ou "enhancer"), soit négativement (on parle alors de répresseurs transcriptionnels ou "silencer"). On considère aujourd'hui qu'il existe plus de 2.000 facteurs de transcription de ce type chez l'Homme, ce qui représente environ 10% du nombre total des gènes. Il s'agit tout simplement de la plus grande famille de protéines chez l'être humain. Ces facteurs possèdent deux domaines particuliers (Figure 30). Tout d'abord un domaine de liaison à l'ADN (ou DNA-Binding Domain, DBD) qui permet au facteur de se lier à une séquence spécifique d'ADN. Il possède ensuite un domaine transactivateur TAD (ou Trans-Activating Domain), permettant au facteur de se lier avec d'autres régulateurs transcriptionnels. Enfin, un troisième domaine, optionnel et appelé "Signal Sensing Domain" (SSD), permet de fixer un élément extérieur (par exemple une hormone), permettant d'activer ou de désactiver ce facteur de transcription, directement en réponse à l'environnement.



**Figure 29: Schéma général de l'initiation de la transcription chez les mammifères.** L'initiation de la transcription nécessite le recrutement séquentiel des facteurs généraux au niveau d'un motif particulier : la TATA box. Les protéines impliquées dans ce processus sont TFIIA, B, D, E, F H et l'ARN polymérase II. TBP : TATA box-Binding Protein.



**Figure 30: Schéma général de la structure d'un facteur spécifique de la transcription** Ce type de facteur est composé de 3 parties : un domaine de liaison à l'ADN (DBD : DNA Binding Domain), un domaine facultatif capable de lier un élément extérieur (SSD : Signal Sensing Domain) et un domaine permettant de lier d'autres protéines régulatrices (TAD : Trans-Activating Domain)



Les facteurs de transcription reconnaissent généralement des petites séquences d'ADN conservées, contenues au niveau des promoteurs de leurs gènes cibles : les éléments de réponse. Certains de ces facteurs et de ces séquences sont communs à plusieurs gènes. Ces gènes peuvent ainsi être régulés soit de manière constitutive (gènes de ménage) en fonction du type cellulaire, soit au contraire de manière spécifique en fonction des facteurs de transcription impliqués en réponse à différents stimuli (Farnham, 2009; Sikorski & Buratowski, 2009).

### **c) Le remodelage chromatinien**

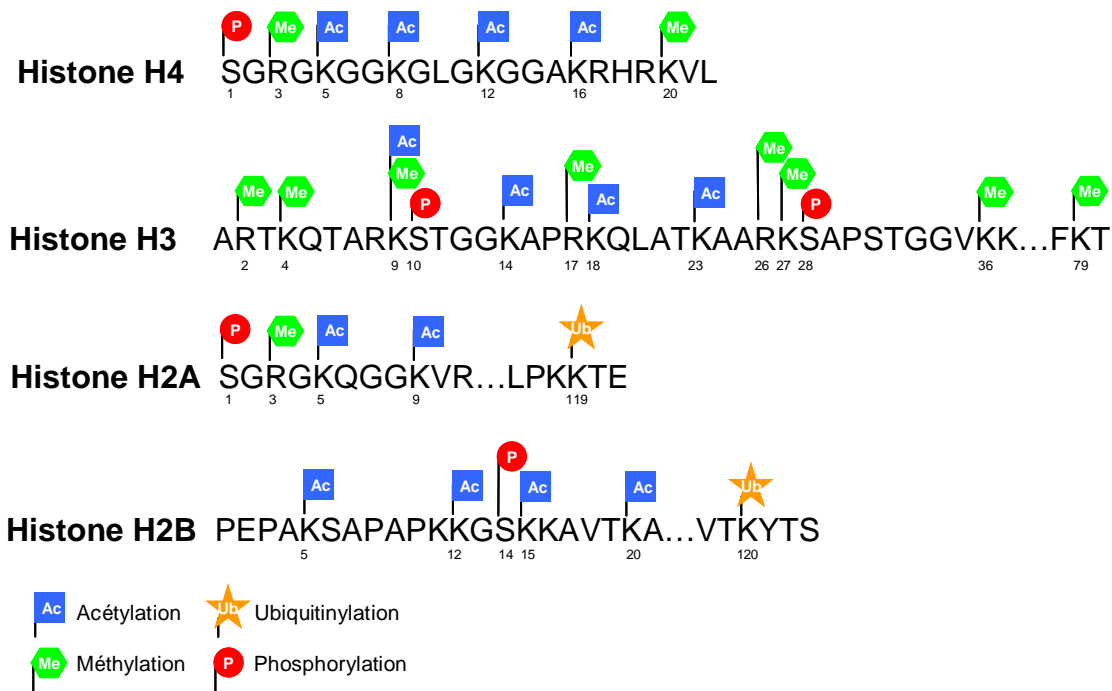
Afin d'avoir une certaine souplesse dans l'expression des gènes, les histones peuvent subir de très nombreuses modifications post-traductionnelles. Ces modifications définissent le "code histone", qui tient à la fois compte de la nature et de la chronologie de ces événements et fait partie intégrante de la régulation de la transcription via le remodelage de la structure chromatinienne (Figure 31) (Lacoste & Cote, 2003).

#### *Acétylation des histones*

L'acétylation des histones est un processus réversible catalysé par des enzymes appelées Histone Acétyl-Transférase (HAT). De nombreux co-activateurs transcriptionnels possèdent une telle activité enzymatique. On peut citer par exemple P300, CBP ou PCAF. Cette acétylation provoque une diminution de la stabilité des interactions ADN-histones, conduisant donc à une forme moins condensée de la chromatine, favorable à la transcription des gènes localisés dans cette région de l'ADN. A l'inverse, les Histones DéACétylases (HDAC) permettent à la chromatine de revenir à un état plus condensé, et donc d'inhiber les processus transcriptionnels.

#### *Méthylation des histones*

Il existe deux types d'Histone Méthyl-Transférase (HMT) selon si elles ciblent des résidus lysine ou arginine. La méthylation de lysines joue souvent un rôle dans la formation de l'hétérochromatine (forme condensée) alors que la méthylation des arginines semble avoir un effet positif sur la transcription. Mais ce n'est pas toujours le cas, ainsi, la méthylation de la lysine 9 de H3 est retrouvée dans l'hétérochromatine alors que la méthylation de la lysine 4 de H3 est liée à l'euchromatine (forme décondensée) (Jenuwein & Allis, 2001).



**Figure 31: Résidus des histones sujets à des modifications post-traductionnelles chez les mammifères.** Dans l'organisme, les histones sont modifiées de manières spécifiques sur certains résidus. Il existe quatre types de modification permettant de moduler la transcription: l'acétylation, la méthylation, l'ubiquitinylation et la phosphorylation. (d'après Lacoste & Côté, 2003)

### Phosphorylation des histones

Le niveau global de phosphorylation des histones fluctue fortement au cours du cycle cellulaire (Bradbury et al, 1973). Cette phosphorylation affecte, entre autre, le résidu sérine 10 des histones H3 et semble être liée de manière très directe au processus de condensation des chromosomes (Wei et al, 1999).

### Ubiquitinylation des histones

Peu de données sont disponibles sur le rôle de l'ubiquitinylation des histones. Quelques études ont montré le rôle important que peut avoir cette modification sur le contrôle de l'expression des gènes. Le phénomène d'ubiquitinylation a été observé sur les histones H1, H3, H2A et H2B. Chez les levures et les mammifères, il a été montré que la mono-ubiquitinylation de H2B pouvait réguler la méthylation de l'histone H3 sur ses lysines 4 et 79 (Zhang, 2003).

## **3.2. Gènes modèles utilisés dans l'étude de la transcription régulée par les acides aminé**

La carence en acides aminés peut induire l'expression de nombreux gènes au niveau transcriptionnel. Certains d'entre eux ont été choisis par plusieurs laboratoires comme gènes modèle afin de déterminer les mécanismes moléculaires mis en jeu dans ce type de régulation. C'est notamment le cas de : *Asparagine Synthétase (ASNS)* *Activating Transcription Factor 3 (ATF3)* et *C/EBP Homologous Protein (CHOP)*. Dans cette partie, ces gènes modèles et leurs différentes fonctions seront présentées. Leurs régulations au niveau de la transcription seront abordées dans la partie suivante.

### **a) Asparagine Synthétase (ASNS)**

L'asparagine synthétase est une enzyme de 550 acides aminés, exprimée de façon ubiquiste, et impliquée dans la synthèse d'asparagine et de glutamate à partir d'aspartate et de glutamine. Chez les mammifères, le gène a d'abord été cloné chez l'Homme (Andrulis et al, 1987), puis dans la lignée cellulaire CHO de hamster et chez le rat (Andrulis et al, 1989) (Greco et al, 1989; Hutson & Kilberg, 1994). L'expression du gène *ASNS* est régulée par la carence en glucides et en acides aminés ainsi que par le stress du réticulum endoplasmique (stress ER) (Barbosa-Tessmann et al, 2000; Barbosa-Tessmann et al, 1999)

Dès 1969, *ASNS* a suscité un grand intérêt pour son rôle dans la résistance aux chimiothérapies (Cooney & Handschumacher, 1970). Ainsi ces traitements administrés lors de leucémies aiguës comportent un traitement à l'asparaginase (enzyme catalysant l'hydrolyse

de l'asparagine en aspartate et de la glutamine en glutamate). La chute de la concentration sanguine en asparagine aboutit progressivement à la disparition des cellules tumorales dans 40 à 60% des cas. Toutefois des résistances ont été observées. Celles-ci proviennent de la capacité des cellules cancéreuses à resynthétiser de l'asparagine en réponse au traitement à l'asparaginase. Ce mécanisme passe notamment par une surexpression d'ASNS par ces tumeurs (pour revue : (Richards & Kilberg, 2006)).

### **b) C/EBP Homologous Protein (CHOP)**

Le gène *C/EBP Homologous Protein (CHOP)*, aussi appelé *Growth Arrest and DNA Damage 153 (GADD153)* code pour une protéine de 19kDa appartenant à la famille des facteurs de transcription C/EBP. Son expression est induite en réponse à un stress du réticulum endoplasmique, une carence en acides aminés, une irradiation aux UV ou encore différents autres stress. Comme les autres membres de cette famille, CHOP est composé d'un domaine d'activation, d'une région leucine Zipper de dimérisation et d'un domaine basique de liaison à l'ADN. Il a été montré que CHOP est capable d'hétérodimériser avec les autres membres de la famille C/EBP. Toutefois, deux prolines étant substituées à deux résidus de la région basique impliquée dans la liaison à l'ADN, les homodimères CHOP/CHOP sont incapables de se fixer à l'ADN (Ron & Habener, 1992). *CHOP* est utilisé comme modèle pour l'étude de la régulation de l'expression des gènes par différents stress cellulaires comme le stress ER ou la carence en acides aminés. Dans un autre domaine, il a été démontré que *CHOP* est surexprimé dans les hépatocytes de rats lors de la phase aigüe de la réponse inflammatoire (Sylvester et al, 1994). Les souris CHOP<sup>-/-</sup> ne présentent pas de phénotypes particuliers. En revanche, un rôle de CHOP a été mis en évidence dans la lignée de souris "Akita". Ces souris ont une mutation du gène de l'insuline 2 entraînant la synthèse d'une protéine mal repliée. Au début de leur vie, ces souris présentent une glycémie normale grâce à une compensation par le gène de l'insuline 1. Mais rapidement un diabète s'installe, et on observe une apoptose des cellules  $\beta$ -pancréatiques due à un important stress ER provoqué par l'accumulation de l'insuline 2 défectueuse (Nozaki et al, 2004). L'invalidation du gène *CHOP* chez ces souris permet de retarder l'apparition du diabète et de diminuer l'apoptose des cellules  $\beta$  du pancréas (Oyadomari et al, 2002).

*In vitro*, CHOP a été impliqué dans différents domaines comme la différenciation cellulaire, l'apoptose ou encore la cancérogenèse. Il a notamment été mis en évidence que CHOP pourrait jouer un rôle dans la différenciation adipocytaire (Tang & Lane, 2000). De par ses propriétés et la diversité des fonctions des facteurs de transcription comme les ATFs ou les

C/EBPs avec lesquels il peut s'hétérodimériser, CHOP est probablement impliqué dans de très nombreux processus de régulation et de phénomènes biologiques.

### **c) Activating Transcription Factor 3 (ATF3)**

Le gène *Activating Transcription Factor 3 (ATF3)* a tout d'abord été isolé d'une banque issue de cellules HeLa traitées avec du tétradécanoylphorbol (TPA). Il code pour un facteur de transcription de 181 acides aminés (20,6kDa). ATF3 présente 65% de similitude avec JDP2 (cofacteur impliqué dans la réponse à la carence en acides aminés, cf. partie 3.3.b.) pour la protéine entière et plus de 80% concernant le domaine bZIP. Par conséquent, ces deux protéines sont classées dans le même sous-groupe de la famille des facteurs de transcription ATF/CREB : le sous-groupe ATF3. Ce facteur est capable de lier des éléments de réponse de type ATF/c-AMP response element (CRE) dont le consensus est 5'-GTGACGT<sup>A</sup>/<sub>C</sub><sup>A</sup>/G-3' (Chen et al, 1996; Liang et al, 1996). Comme les autres membres de sa famille, ATF3 est composé d'un domaine d'activation, d'une région leucine Zipper de dimérisation et d'un domaine basique de liaison à l'ADN. Tous les membres de cette famille ont un domaine de dimérisation relativement bien conservé, ce qui leur permet de former des homo- ou des hétérodimères avec les autres facteurs de transcription, étape essentielle pour qu'il y ait liaison à l'ADN. Ceci va conduire à la régulation transcriptionnelle de l'expression d'un certain nombre de gènes cibles.

Il a été montré que ATF3 est capable de s'homodimériser. Ce dimère est souvent associé à une activité plutôt répressive de la transcription. En revanche, ATF3 peut aussi s'hétérodimériser avec c-Jun, ATF2, JunB et CHOP. Dans ces cas, il peut être activateur ou répresseur de l'expression des gènes cibles (Hai & Hartman, 2001). Si les fonctions physiologiques d'ATF3 ne sont pas clairement définies, plusieurs éléments convergent pour indiquer que ce gène est impliqué dans la réponse cellulaire aux stress extracellulaires. En effet, son expression à l'état basal est faible voire indétectable dans de nombreuses lignées cellulaires. Toutefois la transcription de ce gène est fortement induite par plusieurs stimuli. Dans les modèles animaux, l'expression d'ATF3 est induite localement suite à une ischémie cardiaque, une hépatectomie partielle, un accident cérébral, une plaie de la peau, une cirrhose ou une ischémie rénale, pancréatique, cardiaque ou hépatique. Les études en lignées cellulaires ont montré une induction d'ATF3 suite aux traitements aux UV, radiations, les agents activant les SAPKs (cytokines, anisomycine, cyclohexamide), les inhibiteurs du protéasome (MG132, lactacystin), l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, le stress du réticulum endoplasmique, et les activateurs de PPAR (Chen et al, 1996). Par ailleurs, on remarque que, parmi ces différents

stimuli, un certain nombre active les voies de signalisation aboutissant à la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ . Toutefois, si les inducteurs d'ATF3 sont bien décrits, des questions subsistent concernant les voies de signalisation en amont, le rôle d'ATF3, ses gènes cibles et la spécificité tissulaire de la réponse.

#### **d) Conclusion**

Une carence en acides aminés provoque l'induction de l'expression de nombreux gènes. Cette augmentation comporte une grande composante au niveau transcriptionnel. Ceci a notamment été décrit par l'étude des trois gènes modèles exposés ci-dessus : *ASNS*, *CHOP* et *ATF3*. Cette régulation transcriptionnelle par la carence en acides aminés est médiée par un élément de réponse spécifique : l'AARE (Amino Acid Response Element).

### **3.3. Élément cis-régulateur impliqué dans la réponse à une carence en acides aminés : l'AARE (Amino Acid Response Element)**

La plupart des études de promotologie concernant les gènes *CHOP*, *ASNS* et *ATF3* ont révélé un élément de régulation indispensable à l'induction de ces gènes par la carence en acides aminés : l'AARE. L'identification de cet élément de réponse a permis de déterminer les voies de signalisations impliquées dans la réponse à une carence en acides aminés.

#### **a) Identification de l'AARE**

AARE de *CHOP* : *CHOP* est le gène le plus inductible en réponse à une carence en acides aminés identifiés par Marten *et al.* (Marten et al, 1994). Le clonage de la région promotrice de ce gène (900pb en amont du site d'initiation de la transcription) confère la même inductibilité à un gène rapporteur comme la luciférase. Il faut également noter que cette régulation est spécifique des acides aminés essentiels. Des expériences de délétion du promoteur de *CHOP* ont permis d'identifier une séquence de 33 nucléotides dont l'absence inhibe la réponse à la carence en leucine. L'analyse de cette séquence a permis d'identifier un site mixte C/EBP / ATF (5'-ATTGCATCA-3') localisé entre -313 et -295 du site d'initiation de la transcription. Il fut alors dénommé Amino Acid Response Element (ou AARE). Une mutation dans cette séquence suffit pour perdre l'induction d'un gène rapporteur en réponse à la carence en leucine (Bruhat et al, 2000).

AARE d'*ASNS* : le laboratoire de M.S. Kilberg a aussi identifié une séquence similaire dans le promoteur d'*ASNS* (entre -68 et -60). Cette séquence fut alors désignée par l'acronyme NSRE-1 (Nutrient Sensing Response Element-1) (5'-GTTTCATCA-3'). Cet élément de

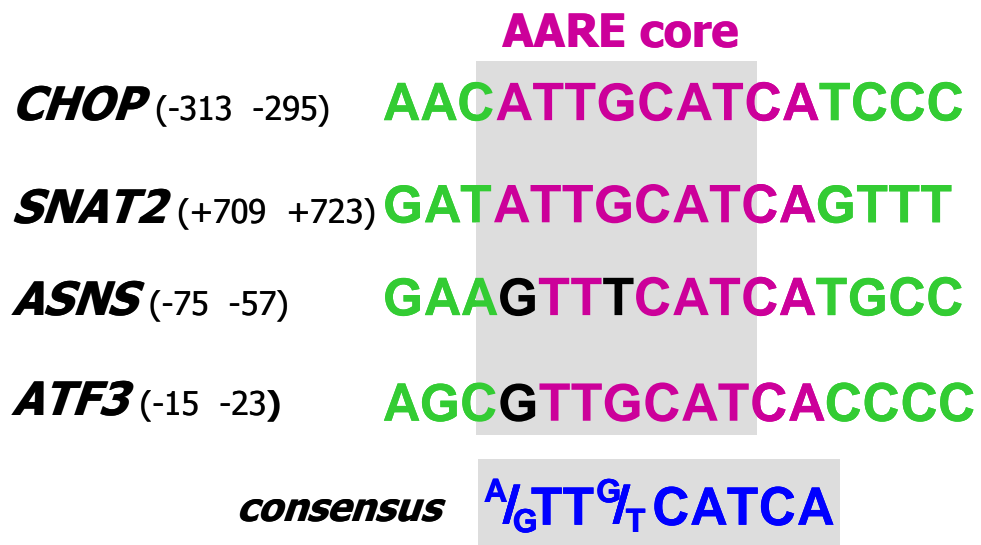
réponse est impliqué dans l'induction d'ASNS par une carence en acides aminés indispensables mais aussi en glucose ou lors de stress du réticulum endoplasmique (Barbosa-Tessmann et al, 2000). Un second NSRE a été localisé dans ce même promoteur sous le nom de NSRE-2 (entre -48 et -43 : 5'-GTTACA-3'). La combinaison de ces deux éléments de réponse (NSRE-1+NSRE-2) fut nommée NSRU (Nutrient Sensing Response Unit) (Zhong et al, 2003). De la même manière que l'AARE de CHOP, le NSRU est capable de conférer à un gène rapporteur une inductibilité par la carence en leucine. De plus, outre la séquence du NSRU, la distance entre les deux NSRE joue également un rôle crucial dans la réponse à la carence en acides aminés. Cette distance correspond à 12 paires de base, soit un tour d'hélice d'ADN. Ce résultat suggère que l'agencement de ces deux éléments de réponse facilite l'interaction entre les facteurs de transcription et ces NSRE.

AARE d'ATF3 : concernant cet AARE, Jiang *et al.* (Jiang et al, 2004) ont montré que la carence en leucine induisait l'accumulation de la protéine ATF3. Les travaux de Liang *et al.* (Liang et al, 1996) ont décrit la structure du gène ATF3 humain ainsi que sa région promotrice (de -1850 à +41pb). Deux sites composites apparaissent comme intéressants : un site ATF/CRE (-93 à 85pb) et un site C/EBP/ATF (-23 à -15pb). Toutefois cette publication étant avant tout descriptive, aucune fonctionnalité n'est indiquée pour ces deux éléments de réponse. Leurs rôles physiologiques ont été décrits par l'équipe de MS. Kilberg en 2007. Les auteurs ont alors déterminé que seul le site composite C/EBP / ATF en -23 à -15bp (5'-GTTGCATCA-3') permettait de conférer à un gène rapporteur une réponse à la carence en acides aminés. Ce site est désormais considéré comme un AARE. Il est à noter que cet AARE diffère que d'une base par rapport à l'AARE de CHOP et celui d'ASNS.

Par la suite, d'autres gènes cibles répondant à une carence en acides aminés et possédant un AARE dans leurs régions promotrices ont été décrits. C'est notamment le cas de SNAT2 (transporteur d'acides aminés neutres) (Palii et al, 2004). Un consensus a alors été donné pour cet élément de réponse : 5'-<sup>A</sup>/<sub>G</sub>TT<sup>G</sup>/<sub>T</sub>CATCA-3' (Figure 32). De plus, les auteurs ont émis l'hypothèse que la forte similarité de séquence entre les différents AARE supposait que les mêmes facteurs de transcription impliqués dans la transcription AARE-dépendante. Deux facteurs trans ont été identifiés comme jouant un rôle clé dans ce mécanisme : ATF4 et ATF2.

### **b) Protéines impliquées dans la transcription AARE-dépendante**

Comme indiqué précédemment, la séquence de l'AARE est un composite C/EBP / ATF. Ceci suggère donc que les facteurs de transcription composants ces deux types de familles peuvent se lier préférentiellement à cet élément de réponse. Les différentes études ont mis en lumière



**Figure 32:** Comparaison des séquences *cis* AAREs impliquées dans la régulation de la transcription des gènes *CHOP*, *SNAT2*, *ASNS* et *ATF3* par la carence en acides aminés.



deux facteurs de transcription ayant un rôle majeur dans la réponse à une carence en leucine : ATF4 et ATF2, mais également plusieurs autres protéines permettant une régulation fine de ce mécanisme. Dans un premier temps, une description générale des facteurs ayant la capacité de se lier aux différents AARE ainsi que leurs fonctions seront données. Puis, en prenant l'exemple de la régulation transcriptionnelle de *CHOP* par la carence en acides aminés, la cinétique d'événements de liaisons de ces facteurs à l'AARE de ce gène sera exposée.

#### *Le facteur de transcription ATF4*

ATF4 (ou CREB2) est un facteur de transcription de 39KDa dont le gène est localisé sur le locus 22q13.1. La forme "murine" est fortement homologue à la forme humaine mais présente une partie N-terminale plus longue de 5kDa. ATF4 fait partie de la famille des facteurs de transcription ATF/CREB (Activating Transcription Factor/Cyclic AMP Response Element Binding protein) et possède un domaine basique leucine-zipper lui conférant la capacité de s'homodimériser ou bien de s'hétérodimériser avec plusieurs partenaires comme les facteurs appartenant aux familles Jun, Fos et C/EBP, des protéines de la machinerie transcriptionnelle comme la sous-unité RPB3 de la RNA Polymérase II ou encore avec des kinases telles que la Zip-Kinase (De Angelis et al, 2003) (Kawai et al, 1998) (Ameri & Harris, 2008). ATF4 a été originellement décrit comme un régulateur négatif de la transcription CRE-dépendante (Karpinski et al, 1992). Toutefois, il est clairement acquis désormais qu'il peut avoir un impact positif sur la transcription des gènes comme RANKL, ostecalcin, VEGF ou plusieurs gènes impliqués dans les fonctions mitochondriales, le métabolisme des acides aminés ou la réponse à un stress oxydant (pour revue : (Ameri & Harris, 2008)). La régulation du niveau cellulaire d'ATF4 passe par l'activation des kinases d'eIF2 $\alpha$  (GCN2, PKR, PERK ou HRI) et l'augmentation de la traduction de son ARNm (Wek et al, 2006).

#### *Le facteur de transcription ATF2*

ATF2 (ou CRE-BP1) est également un facteur de transcription appartenant à la superfamille des ATF/CREB. Il a été cloné à partir d'une banque d'ADNc de cerveau humain pour sa capacité à lier des éléments CRE (Maekawa et al, 1989; Nomura et al, 1993). Le gène codant pour ATF2 est localisé sur le chromosome humain 2q32, et produit une protéine de 505 acides aminés (54KDa) (Bhoumik et al, 2005; Vlahopoulos et al, 2008). Son expression est ubiquiste avec un niveau fort au niveau cérébral (Takeda et al, 1991).

Il existe de nombreuses isoformes d'ATF2 issues d'épissages alternatifs ou de l'expression de promoteurs alternatifs. Plusieurs de ces isoformes partagent les mêmes domaines DNA-

binding ou de dimérisation, coté C-terminal, mais différent par le coté N-terminal (Georgopoulos et al, 1992; Kara et al, 1990). La forme issue d'un épissage alternatif d'ATF2 la plus décrite est ATF2-small (ATF2-sm) qui contient les 2 premiers et les 2 derniers exons de la forme pleine longueur. Ceci produit une protéine de 28KDa, exprimée de façon ubiquiste. Cette forme possède une activité transactivatrice et régule de nombreux gènes notamment au niveau des cellules du myomètre, gènes n'étant pas régulés par ATF2 pleine longueur. En revanche, la fonction de ce variant d'ATF2 n'est toujours pas déterminée (Bailey & Europe-Finner, 2005; Bailey et al, 2002).

ATF2 est essentiellement régulée par modification post-traductionnelle. Ainsi en condition non stimulé, une interaction moléculaire entre le domaine bZIP et le domaine d'activation (acides aminés 1 à 112) inhibe l'activité transcriptionnelle d'ATF2. En revanche, lors de divers stress cellulaires, la phosphorylation des thréonines 69 et 71 (ATF2 humain) va rompre cette interaction conférant à ATF2 une activité transcriptionnelle (Li & Green, 1996). Pour acquérir une activité maximale, ce facteur doit s'associer avec d'autres facteurs de la famille des ATF/CREB (comme ATF1, JDP2 ou CREB) ou de la famille des AP-1(c-Jun, Fos, Fra2). Le choix du partenaire liant ATF2 va conditionner son activité transcriptionnelle (Bhoumik et al, 2005).

La phosphorylation d'ATF2 sur ces thréonines est médiée par l'action des SAPKs (JNK et/ou p38) après une étape de stress ou de dommage à l'ADN (Gupta et al, 1995; Whitmarsh & Davis, 1996). De plus, Ouwens *et al.* (Ouwens et al, 2002) ont montré que ces deux phosphorylations peuvent intervenir de manière séquentielle par le jeu des voies de signalisation Ras/ERK et RalGDS/Src/p38 lors de stimulation par les facteurs de croissances. La phosphorylation de ces deux sites est essentielle pour l'activation d'ATF2. En effet, si l'un de ces sites est muté en alanine, ATF2 perd sa capacité transactivatrice (Morton et al, 2004). Récemment les travaux de Breitwieser W. *et al.* (Breitwieser et al, 2007) ont décrit une souris Knock In (mutations ponctuelles sur un gène) pour les sites de phosphorylation d'ATF2. Ces animaux ont une létalité embryonnaire causée par des défauts de développement cardiaque et hépatique. Ces phénotypes sont concordants avec ceux observés chez les animaux présentant une délétion du DBD d'ATF2, montrant l'importance cruciale de la phosphorylation de ces sites pour l'activité biologique d'ATF2 (Maekawa et al, 1999; Reimold et al, 1996).

Les inducteurs classiques de la phosphorylation sur les thr69 et 71 d'ATF2 sont : l'exposition aux cytokines pro-inflammatoires, les agents génotoxiques (anisomycine, MMS, agents alkylants, MNNG) les UV, les ROS ou les dommages à l'ADN (van Dam et al, 1995).

La sérine 90 est un autre site d'ATF2 phosphorylé en réponse à un traitement au TNF $\alpha$ , aux UV ou à l'anisomycine. En revanche, cet événement n'est pas observé dans les cellules traitées au PMA ou à l'EGF. Dans ces conditions de stimulation, la phosphorylation de ce résidu nécessite la présence de JNK. Au niveau fonctionnel, la mutation de ce résidu sérine en alanine n'affecte ni l'activité transactivatrice d'ATF2 ni sa capacité à recruter une activité HAT (van Dam et al, 1995) (Kawasaki et al, 2000; Morton et al, 2004). Egalement, lors de dommages à l'ADN par des radiations ionisantes, ATF2 peut être phosphorylée par la kinase ATM au niveau des résidus sérines 480 et 498. Cette phosphorylation est indépendante des kinases JNK et p38, et permet le recrutement des protéines Mre11 et Nsb1 impliquées dans la réparation de l'ADN au niveau des foci de cassures double-brin. Ce recrutement ne requiert pas la présence du domaine de liaison à l'ADN d'ATF2 (Bhoumik et al, 2005).

Enfin, ATF2 est un facteur capable de recruter une activité HAT après stimulation. Le groupe de KK.Yokoyama a démontré une activité intrinsèque HAT d'ATF2. Cette activité est localisée au niveau du domaine proline-rich et nécessite la phosphorylation des résidus 69 et 71 en réponse aux UV (Kawasaki et al, 2000). D'autres groupes ont montré le recrutement de complexe HAT de type p300 HAT et TIP60 après stimulation. Ainsi, ATF2, via son domaine b-ZIP, peut interagir directement avec p300 HAT. Cette interaction conduit à une acétylation d'ATF2 sur les lysines 357 et 374. Egalement, ATF2 interagit avec TIP60, une histone acétyltransférase. Après irradiation, l'association ATF2-TIP60 est moins forte. Il en résulte une stabilisation de l'HAT ainsi qu'une hausse de son activité (Bhoumik et al, 2008) (Karanam et al, 2007)

#### Autres facteurs régulant l'activité de l'AARE

Si ATF2 et ATF4 sont les facteurs de transcription majeurs dans la régulation de la transcription AARE-dépendante, d'autres protéines peuvent intervenir afin d'affiner la réponse à la carence en acides aminés.

JDP2 (Jun Dimerization Protein 2) : cette protéine à domaine bZIP peut interagir avec ATF2, c-jun, junB et junD. Cette interaction provoque la répression de la transcription dirigée par jun, ATF2 ou C/EBP $\gamma$  par le recrutement d'une activité histone déacétylase (HDAC3) au niveau du promoteur des gènes cibles (Jin et al, 2006). Notre laboratoire a montré que JDP2 peut lier l'AARE de *CHOP* en condition basale, contribuant à une inhibition constitutive de ce gène. Lors d'une carence en acides aminés, cette liaison est rompue et JDP2 est libéré, levant ainsi la répression (Cherasse et al, 2008).

PCAF (p300/CBP-Associated Factor) : c'est l'homologue de GCN5 chez la levure (75% de similarité). Cette protéine est un co-activateur transcriptionnel possédant une activité histone acétyltransferase. Cette HAT acétyle préférentiellement les lysines 14 des histones H4 et, avec une affinité moindre, les lysines 8 et 13 des histones H3 (Nagy & Tora, 2007). Lors d'une carence en leucine, Cherasse *et al.* (Cherasse et al, 2007) ont montré un recrutement transitoire de PCAF au niveau de l'AARE de CHOP afin de réguler positivement l'expression de ce gène. Cette étape se fait par l'interaction directe de PCAF avec ATF4.

C/EBP $\beta$  (CCAAT/Enhancer-Binding Protein) : cette protéine fait partie des facteurs de transcription à domaine bZIP. Marten *et al.* (Marten et al, 1994) ont montré que le messager de C/EBP $\beta$  s'accumule dans le foie de rat carencé en acides aminés. Egalement, l'équipe de MS. Kilberg a montré que ce facteur pouvait lier les AARE de *SNAT2* et d'*ASNS* *in vivo* en réponse à une carence en acides aminés afin d'augmenter la transcription. Du plus, ce même laboratoire a démontré que C/EBP $\beta$  était phosphorylé en réponse à une carence en acides aminés et que cette phosphorylation était inhibée par un inhibiteur de la voie des MAPK : ERK. En revanche, le rôle précis de ce facteur dans la régulation transcriptionnelle des gènes cibles de la carence en acides aminés reste encore à déterminer (Thiaville et al, 2008a).

TRB3 (Tribble 3) : c'est une pseudokinase dont l'expression est fortement augmentée au cours d'une carence en acides aminés. Cette régulation est strictement ATF4-dépendante. Jousse *et al.* ont montré que la surexpression de TRB3 inhibait l'induction de CHOP et ASNS lors d'une carence en acides aminés. Cette inhibition passe par la fixation de TRB3 sur ATF4, affectant la transcription AARE-dépendante de ces gènes cibles (Jousse et al, 2007).

ATF3 (Activating Factor 3) : comme présenté plus haut, ATF3 est un gène cible de la carence en acides aminés. Il peut également réguler la transcription AARE-dépendante d'autres gènes cibles. Ainsi, Pan *et al.* (Pan et al, 2007) ont montré qu'une carence en acides aminés de 8 heures induisait la fixation d'ATF3 sur l'AARE de son propre gène. Ce facteur peut également lier l'AARE de *SNAT2*, *ASNS* ou *CHOP*. La fixation d'ATF3 sur les promoteurs de ces gènes réprime leurs expressions. Il apparaît clairement qu'ATF3, comme TRB3, participe à la mise en place d'une boucle de régulation négative de la transcription ATF4-dépendante.

### **c) Cinétique des événements de liaison des facteurs contrôlant la transcription de l'AARE, exemple de la régulation du gène CHOP**

Dans un contexte de carence en acides aminés de nombreux facteurs peuvent donc lier et réguler de manière séquentielle la transcription AARE-dépendante. La cinétique de liaison de ces facteurs a particulièrement été étudiée sur le promoteur du gène *CHOP* par notre

laboratoire, en utilisant la technique de Chromatine immuno-précipitation (ChIP) (Bruhat et al, 2009). Ce mécanisme peut être découpé en quatre étapes (Figure 33) :

Etape 1 : A l'état basal, ATF2 est constitutivement fixé à l'AARE de *CHOP*. Cette liaison permet la fixation de JDP2 et de HDAC3. Ceci a pour conséquence une répression de la transcription de *CHOP* notamment par l'hypoacétylation des histones de son promoteur.

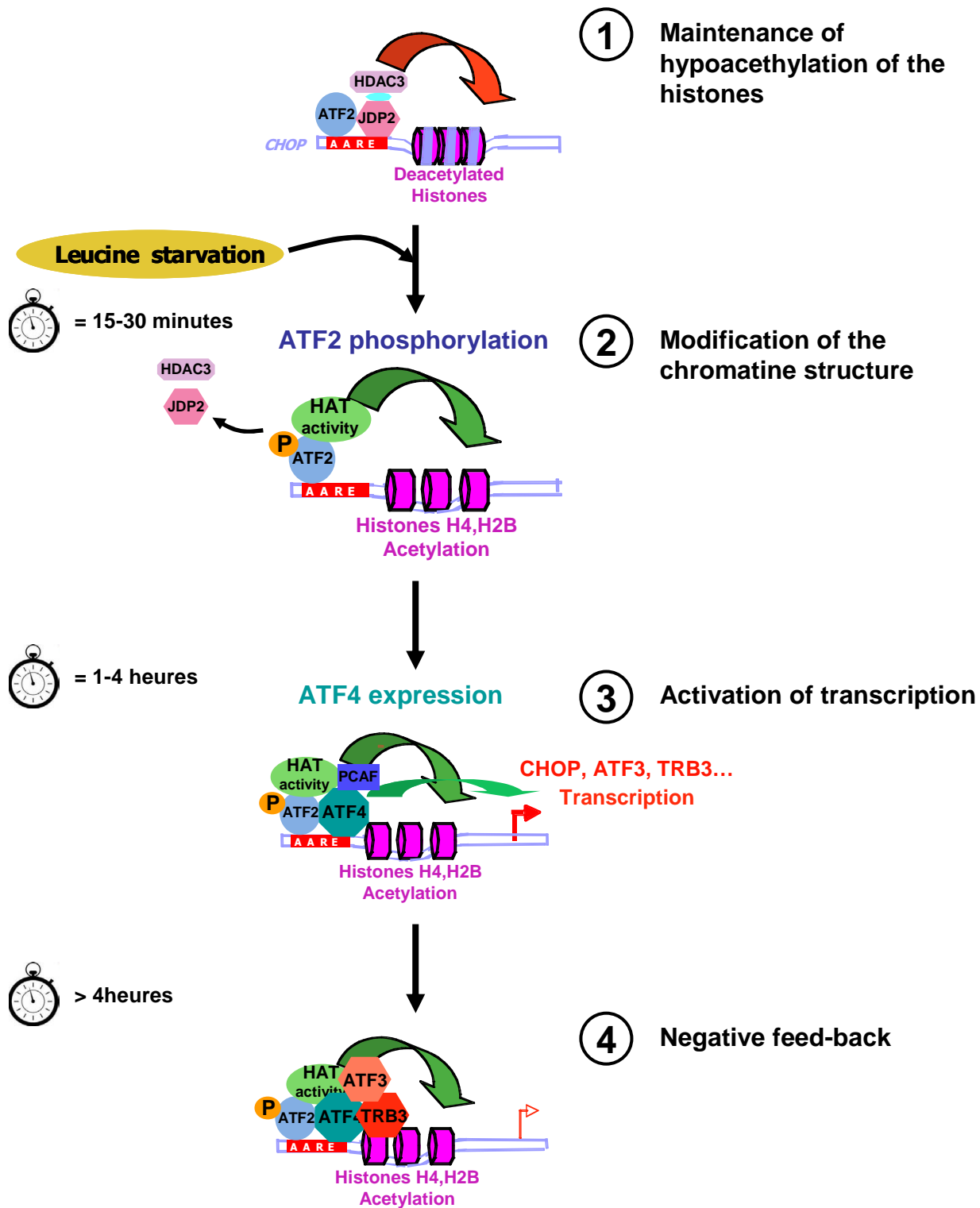
Etape 2 : Lors des temps précoces de la carence en acides aminés, ATF2 est phosphorylé. Cet événement est associé au recrutement d'histone acetyltransferases et le relargage de JDP2 et de HDAC3. La conséquence de cela va être une augmentation de l'acétylation des histones associée à une ouverture de la chromatine favorable à la transcription du gène.

Etape 3 : La carence en acides aminés va provoquer une hausse de la traduction et l'accumulation d'ATF4. Ce facteur va transloquer au niveau du noyau et lier l'AARE de *CHOP*. Cette liaison permet le recrutement de PCAF qui, de part son activité HAT, favorisera d'autant plus la transcription de ce gène. Ce mécanisme atteint son maximal à 4 heures après le début de la carence en acides aminés. En parallèle, la fixation de C/EBP $\beta$  augmente également au niveau de ce même AARE.

Etape 4 : Dans la phase tardive de la réponse à la carence en acides aminés, la transcription et la traduction de gènes cibles comme *ATF3* ou *TRB3*, parallèlement à celle de *CHOP*, vont permettre la mise en place d'une boucle de régulation négative de ce mécanisme. Ces deux facteurs vont alors se lier au complexe situé sur l'AARE de *CHOP* et exercer une répression de la transcription.

#### **d) Rôles des facteurs ATF2 et ATF4 dans la régulation de la transcription AARE-dépendante**

Ces deux facteurs de transcription sont les régulateurs principaux de l'induction des gènes cibles par la carence en acides aminés. Toutefois, les études de leurs fonctions ont révélé des rôles bien spécifiques pour chacun d'eux. Ceci a permis mettre en évidence que, malgré une forte homologie de séquence entre les différents AARE décrits, la dépendance de ceux-ci vis-à-vis notamment d'ATF2, et donc de la voie de signalisation en amont de ce facteur, peut varier. Dans cette partie, les fonctions de ces deux facteurs de transcription ainsi que les voies de signalisation impliquées dans leurs régulations lors d'une carence en acides aminés seront abordées. Egalement, les éléments de la littérature qui permettent désormais de classer les gènes cibles de la carence en acides aminés selon leur critère de dépendance à ATF2 seront présentés.



**Figure 33: Cinétique d'événements de fixation des protéines régulatrices de l'AARE de CHOP au cours d'une carence en acides aminés.** 1) A l'état basal, les protéines ATF2 et JDP2 sont constitutivement fixées à l'AARE. JDP2 recrute une activité HDAC3 contribuant à la répression du gène. 2) Entre 0 et 15-30 minutes de carence en acides aminés, ATF2 est phosphorylé sur la Thr71. Cette phosphorylation participe au recrutement d'une activité HAT sur les histones H2B et H4. JDP2 et l'HDAC3 sont relargués de l'AARE. 3) Entre 1 et 4 heures, l'augmentation de l'expression d'ATF4 et sa fixation à l'AARE permettent le recrutement de PCAF. L'ensemble de ces facteurs participe à l'induction des gènes cible de la carence en acides aminés. 4) Enfin, les protéines ATF3 et TRB3 vont lier l'AARE et réprimer la transcription AARE-dépendante, constituant ainsi une boucle de régulation négative (d'après Bruhat A. *et al*, 2009).

### Rôle d'ATF4

ATF4 a un rôle majeur dans la réponse à une carence en acides aminés. En effet, les analyses de puces à ADN réalisées sur des cellules ATF4<sup>+/+</sup> et <sup>-/-</sup> ont révélé que plus de 80% de gènes induits par ce stimulus (fold $\geq$ 2) sont dépendants de la présence de ce facteur (Jousse et al, 2007). L'activité transactivatrice d'ATF4 en réponse à la carence en acides aminés est associée à une forte hausse de sa traduction (mécanisme décrit en partie 1.2.b.) (Siu et al, 2002). Les expériences de gel-shift ont montré qu'une carence en leucine conférait à ATF4 la capacité de lier le NSRE-1 (AARE de *ASNS*) tout comme l'AARE de *CHOP* (Averous et al, 2004) (Siu et al, 2002). Ces résultats ont été confirmés par de multiples analyses de ChIP dirigés contre ATF4 sur le NSRE-1 ou les AARE de *CHOP* et *ATF3* (Siu et al, 2002) (Pan et al, 2007) (Cherasse et al, 2007). La seule surexpression d'ATF4 active la transcription AARE-dépendante du gène *CHOP* (Shan et al, 2009). A l'inverse, le knock-down par siRNA de ce facteur provoque une inhibition de ce mécanisme (Averous et al, 2004). Ce résultat peut être corrélé par la perte totale d'inductibilité d'*ASNS*, *ATF3*, ou *CHOP* par la carence en acides aminés dans un contexte ATF4<sup>-/-</sup>. Enfin, des travaux menés dans notre laboratoire dans des cellules ATF4<sup>-/-</sup> ont montré qu'environ 60% des gènes répondant à la carence en acides aminés sont dépendants de ce facteur de transcription, démontrant définitivement son importance dans ce contexte (résultats non publiés). Outre son rôle intrinsèque dans la transcription AARE-dépendante, ATF4 joue un rôle clé dans le recrutement de coactivateurs en réponse à la carence en acides aminés. Comme indiqué précédemment, ATF4 permet la liaison du cofacteur PCAF à l'AARE de *CHOP*, en réponse à la carence en leucine. Ce recrutement a un effet positif sur la transcription de *CHOP* (Cherasse et al, 2007). A l'inverse, il peut également interagir avec TRB3 au niveau de ce même AARE afin de réguler négativement la transcription de ce *CHOP* dans la phase tardive de la réponse à la carence en leucine. Pris dans son ensemble, ATF4 est le régulateur transcriptionnel indispensable de la plupart des gènes répondant à la carence en acides aminés.

### Rôle d'ATF2

ATF2 joue également un rôle essentiel dans la phase précoce de l'induction de certains gènes cibles de la carence en acides aminés. Contrairement à ATF4, son niveau d'expression ne varie pas au cours d'une carence en leucine. En revanche, les analyses de gel retard et de ChIP ont montré que ce facteur est lié constitutivement à l'élément de réponse AARE de *CHOP* et *ATF3* et est phosphorylé sur la thréonine 71 en l'absence d'acide aminé (Averous et al, 2004; Bruhat et al, 2007). Concernant le rôle de ce facteur dans cette réponse, la littérature rapporte

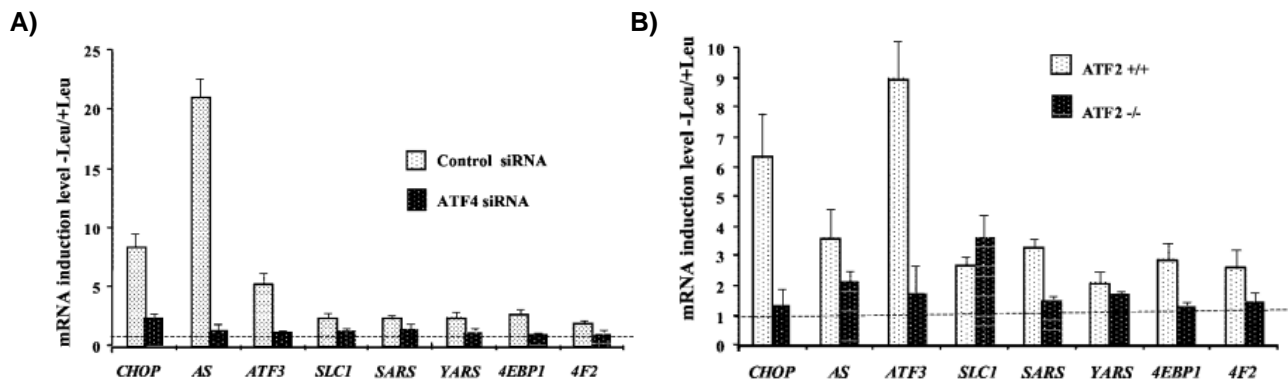
deux fonctions distinctes : i) celle d'activatrice de la transcription, ii) celle de régulatrice du recrutement de cofacteurs au niveau de l'AARE.

Rôle d'ATF2 en tant qu'activateur de la transcription : La plupart des travaux ont été réalisés sur des MEF invalidés pour ATF2. Ceux-ci montrent que ce facteur de transcription est indispensable pour l'induction des gènes *CHOP*, *ATF3*, *SARS* ou *4EBP-1* en réponse à une carence en acides aminés (Figure 34) (Averous et al, 2004). En revanche, la perte d'ATF2 n'affecte pas l'induction d'un second groupe de gènes cibles de la carence en acides aminés : *SNAT2*, *ASNS* et *TRB3* (Bruhat et al, 2007). Le défaut d'expression d'ATF2 n'affectant pas la liaison d'ATF4 à l'AARE de ces gènes en réponse à une carence en acides aminés, ce résultat connote l'aspect strictement ATF4-dépendant de ces gènes. Ceci est d'autant plus intéressant que les séquences "core" des AARE de *SNAT2* et *CHOP* sont parfaitement identiques (ATTGCATCA) et laisse supposer un rôle important des régions flanquantes de ces AARE dans la sensibilité à ATF2.

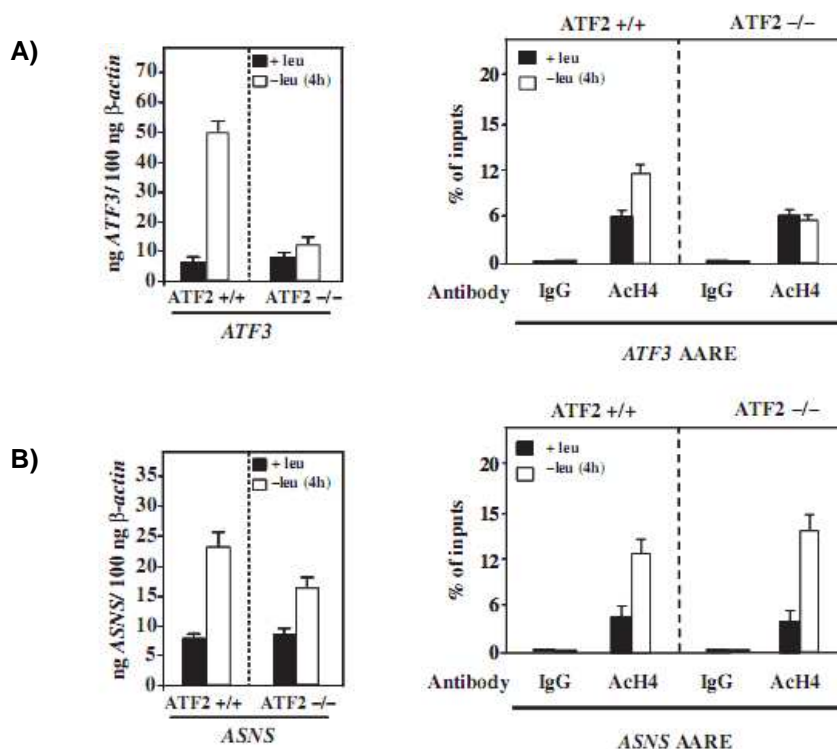
Rôle d'ATF2 dans le recrutement de cofacteurs : ATF2 joue également un rôle dans le recrutement de cofacteurs afin d'orchestrer les modifications chromatinienne nécessaires à la régulation de la transcription AARE-dépendante. Ainsi, à l'état basal, les corépresseurs transcriptionnels JDP2 et HDAC3 (Histone DéAcétylase 3) interagissent directement avec ATF2 au niveau de l'AARE. Ceci a pour conséquence une répression basale de la transcription, en partie due au statut hypoacétylé des histones. En revanche, au cours de la phase précoce de carence en acides aminés, HDAC3 et JDP2 sont libérés et une activité HAT est recrutée induisant une acétylation des histones H4 et H2B au niveau de l'AARE de *CHOP* et des histones H4 pour celui d'*ATF3* (Cherasse et al, 2008) (Bruhat et al, 2007) En revanche, si les histones H4 régulant l'activité de l'AARE d'*ASNS* sont également acétylées, ce mécanisme est ATF2-indépendant. Ce résultat est à corrélérer avec le caractère ATF2-indépendant de ce gène au niveau de sa transcription AARE-dépendante (Figure 35). On peut donc conclure que le recrutement de cette activité HAT est un événement strictement ATF2-dépendant (et non ATF4-dépendant). Toutefois, l'ensemble de ces travaux ont été réalisés dans un modèle cellulaire knock-out pour l'expression d'ATF2 et ne permettent pas de préciser le rôle spécifique de la phosphorylation d'ATF2 dans ces mécanismes.

Dans leur ensemble, ces résultats suggèrent donc l'existence d'une seconde signalisation non déterminée, activée par une carence en acides aminés, aboutissant à la phosphorylation d'ATF2 et la mise en place d'événements transcriptionnels et de modifications chromatinienne spécifiques à une sous-classe de gènes cibles (Averous et al, 2004) (Bruhat et al, 2007; Bruhat et al, 2000).





**Figure 34: Dépendance vis-à-vis d'ATF4 et/ou ATF2 des gènes cibles de la carence en acides aminés.** Il existe deux classes de gènes induits au cours d'une carence en acides aminés selon leurs dépendances au facteur de transcription ATF2. L'induction des gènes présentés est exprimée en fold (+Leucine/-Leucine). **A)** Dépendance des gènes cibles à ATF4 : parmi tous les gènes testés, tous requièrent la présence d'ATF4 afin d'être induit par une carence en leucine. (pas d'induction dans les cellules traitées avec le siRNA dirigé contre ATF4) **B)** Dépendance des gènes cibles à ATF2 : en revanche, on remarque que certains gènes sont strictement ATF2-dépendant (CHOP, ATF3, SARS, 4EBP1 4F2) alors que d'autres sont ATF2-indépendants (ASNS, SLC1, YARS) (extrait de Averous J. *et al*, 2004).



**Figure 35: Dépendance vis-à-vis d'ATF2 des gènes ATF3 et ASNS dans l'acétylation des histones H4 en réponse à une carence en acides aminés.** **A)** ATF3 est un gène cible de la carence en leucine nécessitant l'expression d'ATF2 pour être induit (panel de gauche). Les expériences de ChIP montrent que l'acétylation de l'histone H4 induite par ce stimulus requière également l'expression de ce facteur (panel de droite). **B)** A l'inverse, ASNS est un gène ATF2-indépendant en réponse à cette même carence (panel de gauche). Ceci est conforté par le fait que l'acétylation de l'histone H4 en réponse à la carence en leucine est également ATF2-indépendante (panel de droite) (extrait de Bruhat A. *et al*, 2007).

### Conclusion

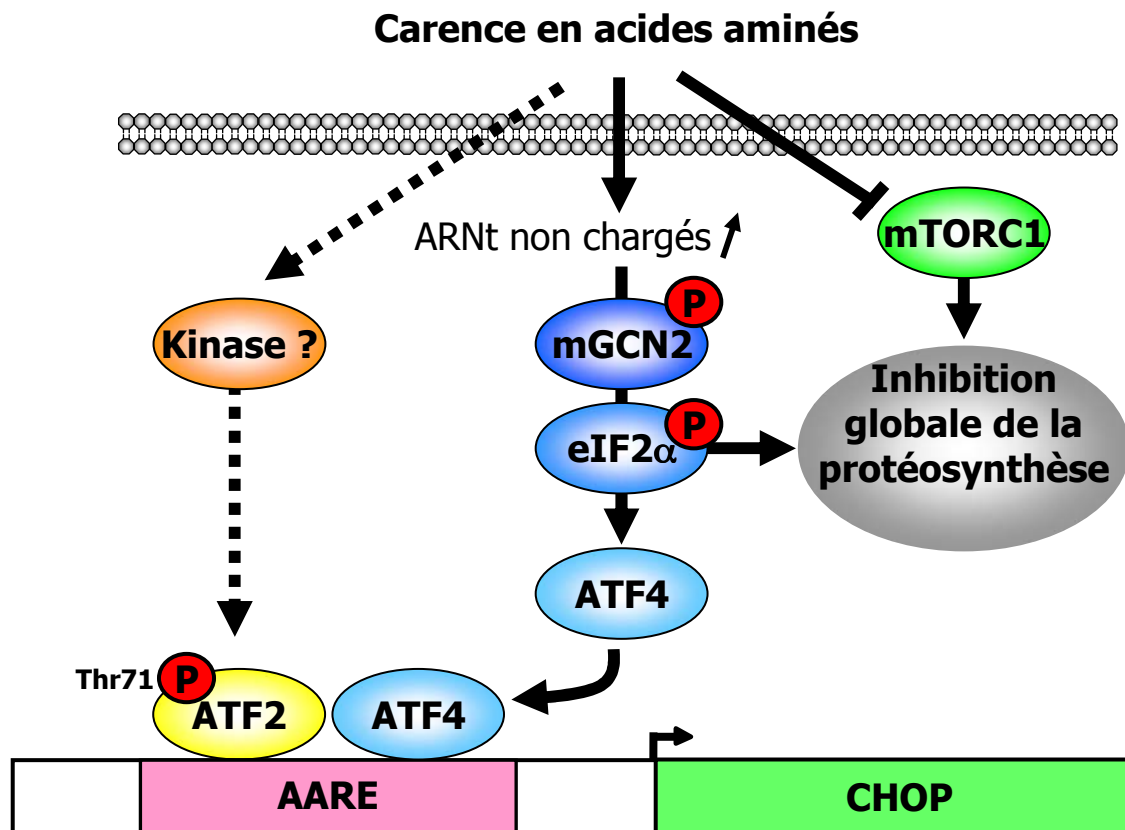
Malgré une forte homologie de séquence entre les différents AARE des gènes cibles de la carence en acides aminés, on remarque que ces gènes ne sont pas régulés de la même manière au cours de ce stimulus. Si tous les gènes décrits ci-dessus sont clairement ATF4-dépendants, en revanche leurs sensibilités par rapport à ATF2 diffèrent. L'existence de ces deux classes de gènes, répondant à la carence en acides aminés (ATF2-dépendants/indépendants), permet de conférer une plus grande flexibilité dans la magnitude, la rapidité et la spécificité des gènes induits par ce stimulus.

#### **e) Voies de signalisation en amont d'ATF4 et ATF2**

Il est acquis que plusieurs voies de signalisation sont régulées au cours d'une carence en acides aminés. Dans ce paragraphe, nous nous focaliserons sur les deux principales voies menant à l'activation des deux facteurs de transcription essentiels lors de la réponse à la carence en acides aminés : ATF4 et ATF2.

Voie de signalisation en amont d'ATF4 : En réponse à la carence en acides aminés, la kinase mGCN2, activée par l'accumulation d'ARNt non chargés, va phosphoryler eIF2 $\alpha$  (Figure 36). Outre la diminution globale de la synthèse protéique, ceci va provoquer l'augmentation de la traduction d'ATF4. Ce mécanisme, analogue à celui de GCN4 chez la levure, a été décrit dans la partie 1.2.b. Ce facteur va alors s'accumuler et transloquer au niveau nucléaire pour fixer les éléments de réponse à la carence en leucine. Cette fixation sur l'AARE de CHOP est maximale après 4 heures de carence en leucine, puis tend à régresser par la suite. Ceci aura pour conséquence l'induction, de concert avec ATF2 si nécessaire, de la transcription des gènes cibles de la carence en acides aminés.

Voie de signalisation en amont d'ATF2 : Si le rôle du facteur ATF2 dans la réponse à la carence en acides aminés est bien décrit, en revanche, celui de sa phosphorylation ainsi que la voie de signalisation en amont de celui-ci restent encore à déterminer. L'identification de cette voie est le projet qui m'a été confié au cours de cette thèse.



**Figure 36: Voies de signalisation activées par la carence en acides aminés et régulant l'expression du gène *CHOP*.** Au cours d'une carence en acides aminés, la répression de mTORC1 va conduire à l'inhibition globale de la protéosynthèse. L'accumulation des ARNt non chargés induit l'autoactivation de la kinase mGCN2 qui en réponse va phosphoryler la sous unité  $\alpha$  du facteur d'initiation de la traduction eIF2. Cette phosphorylation va participer à l'inhibition de la protéosynthèse. En revanche, la traduction d'ATF4 va être augmentée. L'accumulation de ce facteur va provoquer sa translocation au niveau nucléaire et sa fixation à l'AARE de CHOP. En parallèle, le facteur ATF2, constitutivement fixé à l'AARE, va être phosphorylé sur la Thr71 par une kinase encore non déterminée.

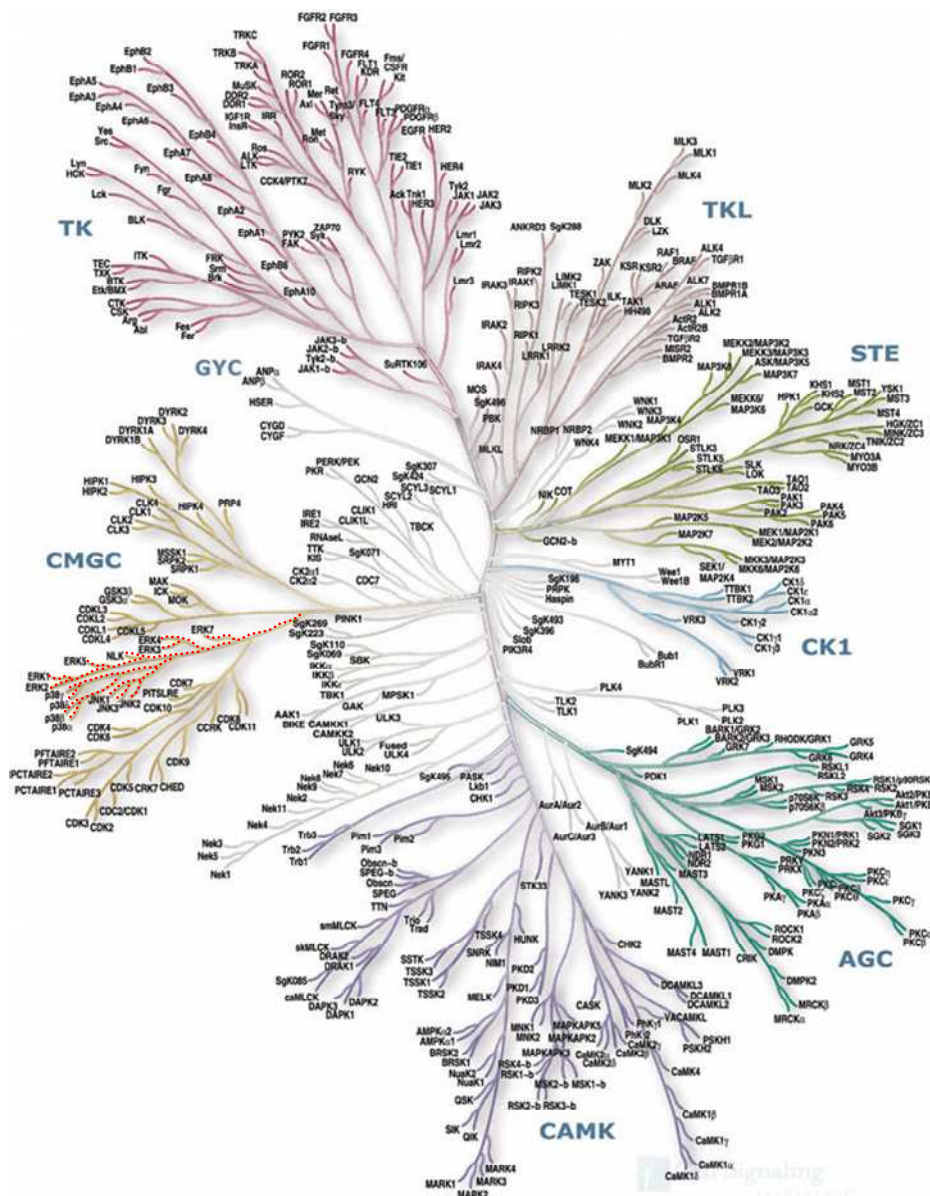
# Chapitre IV. Les voies de signalisation des Mitogen Activated Protein Kinases

Les MAPKs (ou Mitogen Activated Protein Kinases) sont une famille de sérine/thréonine kinase conservée chez tous les eucaryotes et jouant un rôle crucial dans la régulation d'une large variété de processus biologiques. Au niveau phylogénétique, elles dérivent du groupe de kinases CMGC (Cyclin-dependent kinases, Mitogen-activated protein kinases, Glycogen synthase kinases, et CDK-like kinases). Tous les membres des MAPKs partagent plus de 40% d'identité de leurs séquences en acides aminés au niveau du domaine kinase avec ERK1 (Extracellular signal-Regulated Kinases 1) (Figure 37) (Kannan & Neuwald, 2004). Cette branche de kinases coordonne la réponse à une multitude de stimuli extracellulaires que sont notamment : les hormones, les facteurs de croissance, les cytokines, les peptides vasoactifs, les chocs osmotiques, les rayons ionisants, les dommages ischémiques, les intégrines... De ce fait, les MAPKs jouent un rôle central dans la régulation de processus cellulaires comme la prolifération, la différenciation, l'embryogenèse, ou l'apoptose ; particulièrement par la régulation de l'expression de gènes cibles (Raman et al, 2007).

Les MAPKs font partie des voies de signalisation régulées par une cascade de phosphorylation. Elles sont organisées en niveaux de phosphorylation ayant généralement lieu dans le cytoplasme et appelés le module MAPK. Celui-ci se décompose en 3 événements de phosphorylation : la MAP kinase en elle-même, activée par une MAP kinase kinase (MAP2K), elle-même activée à son tour par la MAP kinase kinase kinase (MAP3K) (Tableau 6).

Historiquement, les premières MAPKs (KSS1P et Fus3p) ont été identifiées au début des années 1990, dans la voie de signalisation des phéromones chez *Saccharomyces cerevisiae* (Courchesne et al, 1989). Puis leurs homologues chez les mammifères ont été clonés : ERK1, ERK2 et ERK3, formant une nouvelle famille de protéines kinases (Boulton et al, 1991a; Boulton et al, 1990; Boulton et al, 1991b; Elion et al, 1990).

L'activité kinase de ERK1 et ERK2 fut mesurée sur les substrats MBP (Myelin Basic Protein) et MAP2 (Microtubule-Associated Protein-2). A l'époque, le nom de MBP et MAP2 kinase fut retenu (Ahn et al, 1990; Ray & Sturgill, 1988). Puis, l'acronyme MAP kinase fut conservé mais avec un sens différent (Mitogen-Activated Protein kinase) du fait qu'elles avaient été



**Figure 37: Représentation phylogénique du kinome.** Les MAPKs dérivent du groupe de kinases CMGC. La branche correspondant aux MAPKs est représentée en pointillés rouges. AGC Containing PKA, PKG, PKC families; CAMK : Calcium/calmodulin-dependent protein kinase; CK1 : Casein kinase 1; CMGC : CDK, MAPK, GSK3, CLK families; STE Homologs of yeast Sterile 7, Sterile 11, Sterile 20 kinases; TK : Tyrosine kinase; TKL : Tyrosine kinase-like. <http://www.cellsignal.com/reference/kinase/overview.html>

	MLK1/2/3/7; LZK	TAO1/2	MEKK2/3	???	TAK1	???
<b>MAPKKK</b>	RAF-1/A/B c-MOS	TAK1; TPL2 ASK1-4; DLK ASK1/2; MLTK	ASK1 TAK1 MEKK1-4	TPL2	???	???
<b>MAPKK</b>	MEK1/2	MKK4/7	MKK3/6	MEK5	ERK3 K (?)	HIPK2 (?)
<b>MAPK</b>	ERK1/2	JNK1/2/3	p38α/β/γ/δ	ERK5	ERK3/4	NLK
						ERK7

**Tableau 6: Architecture des différents modules MAPK chez l'homme.** En réponse aux stimuli extracellulaires, les MAPKKK (MAP3K) sont induites. Elles vont alors phosphoryler les MAP2K qui vont à leur tour phosphoryler les MAPK. Ces 3 étapes de phosphorylation sont regroupées dans un module MAPK (d'après Coulombe et al., 2007).

isolées pour la première fois dans les années 1980 comme étant des tyrosines kinases stimulées par des agents mitotiques (Rossomando et al, 1989)

Depuis, chez l'homme, au moins 14 gènes codant pour les membres des MAP kinases ont été identifiés définissant ainsi 7 voies de signalisation distinctes : les voies ERK (ERK1/2), JNK (c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinases 1/2/3), p38 (p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$ ), ERK5 (ERK5), ERK3s (ERK3, ERK4) et ERK7s (ERK7/8) et NLK (Nemo Like Kinase) (Schaeffer & Weber, 1999) (Pearson et al, 2001). Toutefois, les voies ERK, JNK et p38 furent les plus étudiées au cours de ces dernières années.

## **1. Les MAPKs : deux groupes de kinases distincts**

Les MAPKs sont divisées en deux grands sous-groupes : les MAPKs conventionnelles et les MAPKs atypiques (Figure 38). Le premier groupe de kinases renvoie à l'image classique de la signalisation des MAPKs dans laquelle chacune d'elles est le substrat d'une MAP2K. En revanche le groupe des kinases atypiques a été moins étudié et leurs MAP2K correspondantes n'ont pas encore été identifiées (Coulombe & Meloche, 2007).

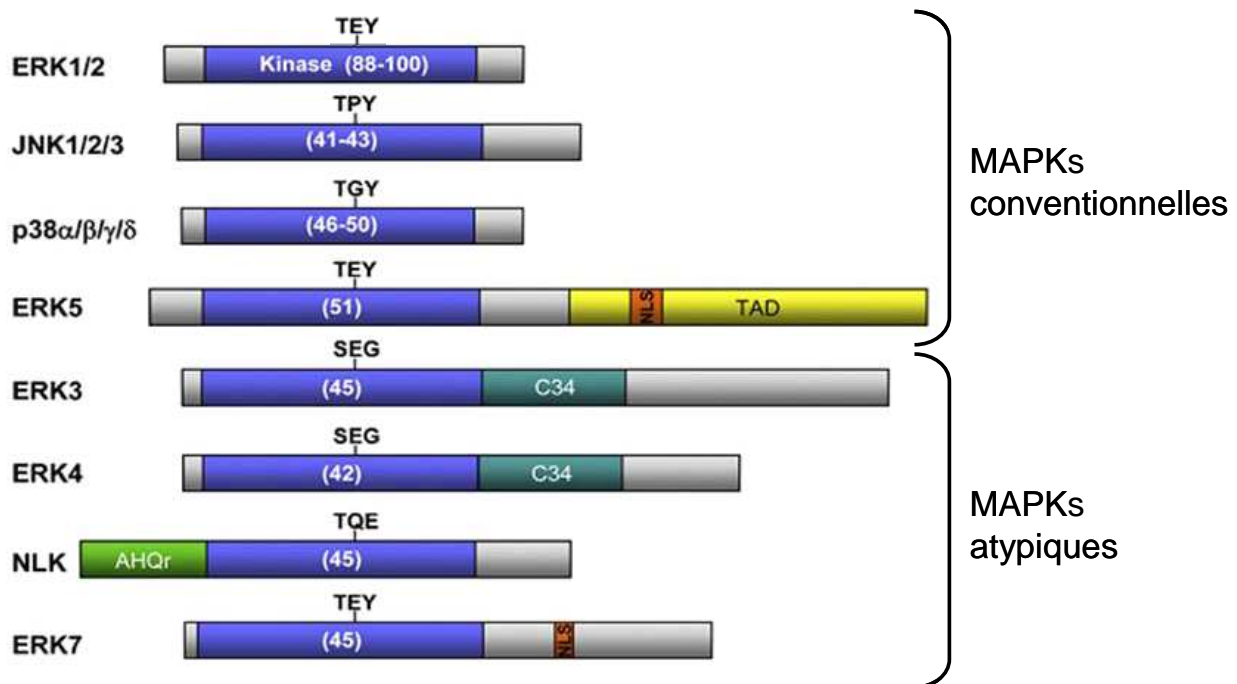
### **1.1. Les MAPKs « conventionnelles »**

Ce groupe de kinase est certainement le plus étudié parmi l'ensemble des MAPKs. Il regroupe les kinases ERK1/2, ERK5 et les SAPKs (Stress-Activated Protein Kinases : p38 et JNK). Ces kinases ont pour caractéristique commune d'être activées obligatoirement par double phosphorylations concomitantes, sur les motifs conservés du sous-domaine kinase VIII : Thr-Xxx-Tyr par les MAP2K en amont (Coulombe & Meloche, 2007; Raman & Cobb, 2003).

#### **a) Les Extracellular signal-Regulated Kinases 1 et 2 (ERK1/2)**

Chez les mammifères, ERK1 fut la première MAPK clonée. C'est une sérine/thréonine kinase possédant une grande identité de séquence avec KSS1 (51%) et FUS3 (52%). Elle fut identifiée pour sa capacité à phosphoryler MAP2 en réponse à l'insuline. Par la suite, ce type de signalisation a souvent été corrélé à la prolifération cellulaire en réponse aux facteurs de croissance. Une activation constitutive de cette voie est d'ailleurs associée à une immortalisation cellulaire (Meloche & Pouyssegur, 2007).

La voie classique ERK est composée de 2 MAPKs : ERK1 (43KDa) et ERK2 (41KDa) possédant 84% de similarité entre elles, et notamment le même site de phosphorylation : TEY (Thr-Glut-Tyr) (Lloyd, 2006). Si ces 2 kinases sont ubiquistes, leurs niveaux d'expression peuvent varier selon les tissus. Ainsi dans les cellules issues du neuroderme, les deux formes



**Figure 38: Représentation des MAPKs humaines.** Les MAPKs sont composées d'un domaine kinase (en bleu) dans lequel le nombre indiqué correspond au pourcentage d'homologie avec le domaine kinase de ERK1. Ces kinases sont réparties en deux groupes: les MAPKs conventionnelles et les MAPKs atypiques. Le motif d'activation de chacune est indiqué. TAD : transactivation domain, NLS : Nuclear localization domain, C34 : domaine conservé entre ERK3 et ERK4, AHQr : Alanine (A)-histidine (H)-glutamine (Q) rich domain (d'après Coulombe *et al.*, 2007).



de ERK sont exprimées de manière équivalente, en revanche ERK2 est majoritaire dans les cellules immunitaires (Pearson et al, 2001).

Les souris invalidées pour ERK1 sont viables et fertiles. Ces souris présentent des défauts de développement des thymocytes mais également de la plasticité neuronale et d'apprentissage (Pages et al, 1999) (Mazzucchelli et al, 2002) (Selcher et al, 2001). De plus, l'invalidation d'ERK1 prévient la survenue de l'obésité par défaut de différenciation des adipocytes (Bost et al, 2005). Le knock-out de ERK2 provoque une létalité embryonnaire à jE=6.5 due à un défaut de formation du mésoderme, de l'ectoderme et du cône ectoplacentaire. Ce phénotype est "réversé" par expression transgénique de ERK2, montrant bien qu'il s'agit d'un phénotype spécifique de cette kinase (Saba-El-Leil et al, 2003; Yao et al, 2003). Egalement, l'utilisation d'un KO conditionnel a montré que ERK2 est essentielle au développement des cellules T (Fischer et al, 2005).

### **b) ERK5**

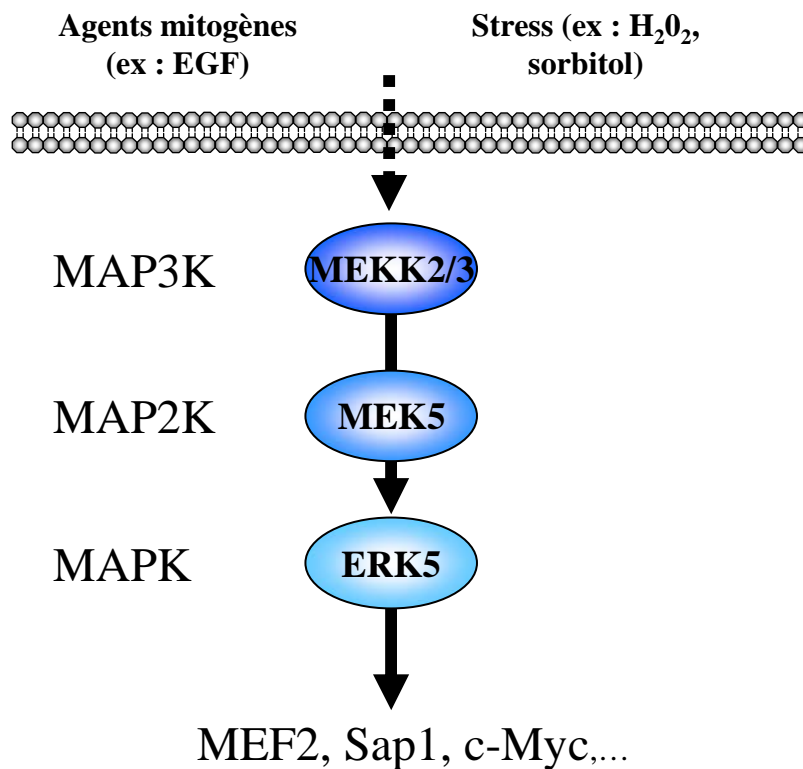
ERK5, aussi appelée Big MAPK 1 (BMK1) est une kinase de 816 acides aminés (98 kDa). Son surnom provient du fait qu'elle ait une masse moléculaire deux fois supérieure aux MAPKs classiques (Wang & Tournier, 2006). ERK5 est stimulée par la double phosphorylation sur son motif TEY (Thr-Glut-Tyr) en réponse à un stress oxydatif, aux facteurs de croissance, ou à un choc osmotique (Mody et al, 2003) (Kondoh et al, 2006).

Il existe 3 isoformes d'ERK5 issues d'épissages alternatifs :  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Cependant, ERK5 $\beta$  et  $\gamma$  ne possèdent pas de domaine kinase, les rendant incapables de phosphoryler leurs substrats. Elles agissent alors comme des dominants négatifs de ERK5 $\alpha$  auprès de la MAP2K : MEK5 (Yan et al, 2001). Egalement une quatrième isoforme d'ERK5 a été décrite : ERK5-T. Celle-ci possède une forme tronquée du côté C-terminal. Il en résulte une séquence où le NLS (Nuclear Localization Signal) est absent. De ce fait, ERK5-T ne peut pas transloquer au niveau nucléaire après stimulation (McCaw et al, 2005).

MEK5 est la seule MAP2K de ERK5 identifiée (Figure 39). Les fonctions de MEK5 ont surtout été caractérisées par l'étude des souris MEK5 $^{-/-}$ . Ainsi, comme les animaux ERK5 $^{-/-}$ , elles présentent des défauts de développement cardiaque et meurent à jE=10,5 (Wang et al, 2005) (Regan et al, 2002). Les MAP3K : MEKK2 et MEKK3 sont connues pour pouvoir activer MEK5 lors de stimuli comme le traitement à l'EGF ou à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (English et al, 1995) (Chao et al, 1999) (Sun et al, 2001).

Les substrats connus de ERK5 sont c-Myc, Sap1 et MEF2A, B, C et D. Notamment la phosphorylation de MEF2C par ERK5 régule positivement l'expression du gène c-jun (Kato





**Figure 39: Régulation de ERK5 par les agents mitogènes et les stress extracellulaires.** ERK5 est activée par double phosphorylation sur des résidus thr et tyr par la MAP2K : MEK5. Cette dernière peut être phosphorylée soit par MEKK2 ou MEKK3 en réponse à des stimuli mitogéniques ou de stress (d'après Wang e al., 2006).

et al, 1997) (Kato et al, 2000) (Yang et al, 1998a) (English et al, 1998) (Kamakura et al, 1999).

### **c) Les Stress Activated Protein Kinases (SAPKs)**

Les SAPKs sont une sous-famille des MAPKs activées par les multiples phénomènes de stress cellulaires. Elles regroupent les isoformes de p38 et JNK.

#### **p38**

p38 fut identifiée comme étant une kinase de 38 kDa, répondant aux traitements par les endotoxines et chocs osmotiques (Han et al, 1994). Le clonage de l'ADNc de p38 a révélé qu'elle est l'homologue de Hog1, une MAPK jouant un rôle de senseur osmotique chez la levure (Brewster et al, 1993). Si p38 $\alpha$  fut identifiée comme la kinase répondant aux stress (choc osmotique, arsenic, choc de température) et aux traitements par le facteur de croissance CSF-1 et par l'interleukine 1, par la suite, trois autres gènes codant pour des isoformes de p38 ont été identifiés. Ceci porte à quatre le nombre d'isoformes de p38 : p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  (ou ERK6) et p38 $\delta$ . Ces 4 isoformes de p38 possèdent un même site d'activation TGY (Thr-Gly-Tyr)(Rouse et al, 1994) (Freshney et al, 1994; Jiang et al, 1996) (Mertens et al, 1996) (Goedert et al, 1997a) (Li et al, 1996). De plus, il a été montré que p38 $\beta$  pouvait subir des épissages alternatifs (Enslen et al, 1998) (Kumar et al, 1997)

Ces isoformes ont été subdivisées en 2 groupes selon leurs analogies de séquences, leurs susceptibilités aux inhibiteurs SB203580 et SB202190 et leurs substrats:

- $\alpha/\beta$  = 75% d'homologie entre elles alors que  $\gamma/\delta$  = 62 et 61% par rapport à p38 $\alpha$ .

- uniquement  $\alpha$  et  $\beta$  sont sensibles aux inhibiteurs cités (Kuma et al, 2005) (Cuenda et al, 1997).

- $\gamma/\delta$  phosphorylent plus facilement la protéine Tau que les isoformes  $\alpha/\beta$ , en réponse au choc osmotique (Feijoo et al, 2005) (Goedert et al, 1997b). Ceci est également vrai pour les protéines  $\alpha$ 1-syntrophin, SAP90/PSD95 et SAP97/hDlg (Hasegawa et al, 1999) (Sabio et al, 2005). A l'inverse, MAPKAPK2/3 (MAPK Activated Protein Kinase 2/3) et la glycogène synthase sont préférentiellement phosphorylées par  $\alpha$  et  $\beta$  (Goedert et al, 1997a) (Cuenda et al, 1997) (Kuma et al, 2004).

Si la localisation de p38 peut être à la fois au niveau nucléaire et cytoplasmique à l'état basal, une fois activée, la majorité transloque vers le noyau. Une faible partie peut rester au niveau cytoplasmique, notamment pour phosphoryler et activer de nombreuses kinases. Le premier substrat cytosolique de p38 à avoir été déterminé fut MAPKAPK2. Par la suite, de

MAPK	Phenotype	Disease and cancer model
MAPK14 <sup>-/-</sup> (p38 $\alpha$ )	Placental defect, death by E12.5	Not applicable
MAPK14 <sup>f/f</sup> X More-Cre	Postnatal death, hyperproliferation of fetal haematopoietic cells	Not applicable
MAPK14 <sup>f/f</sup> X RERTn-Cre	Lung hyperplasia	Lung cancer increased (Kras <sup>G12V</sup> )
MAPK14 <sup>f/f</sup> X Alb-Cre; Mx-Cre	Erythroid proliferation defects	Liver cancer increased (DEN and Pb)
MAPK14 <sup>f/f</sup> X MLC-2a-Cre	Proliferation of adult cardiomyocytes	Not determined
MAPK14 <sup>f/f</sup> X Lys-Cre	Reduced cytokine production	Sepsis (LPS)
MAPK14 <sup>f/f</sup> X K14-Cre; Lys-Cre	Reduced inflammatory responses	Skin injury (SDS and Uvb)
MAPK11 <sup>-/-</sup> (p38 $\beta$ )	No phenotype	Not determined
MAPK12 <sup>-/-</sup> (p38 $\gamma$ )	No phenotype	Not determined
MAPK13 <sup>-/-</sup> (p38 $\delta$ )	Impaired insulin secretion and survival of pancreatic $\beta$ -cells	Diabetes, SkinCancer (DMBA and TPA) and lung cancer (KrasG12V) reduced

**Tableau 7: Phénotypes des souris knock-out pour p38.** (extrait de Wagner EF. et Nebreda AR., 2009)

nombreuses kinases cibles de p38 ont été identifiées : MAPKAPK3, MNK1 et 2, PRAK et MSK1 (Ben-Levy et al, 1998; Raingeaud et al, 1995; Rouse et al, 1994) (Freshney et al, 1994; McLaughlin et al, 1996; New et al, 1998; Waskiewicz et al, 1997) (Deak et al, 1998). Au niveau nucléaire, les facteurs de transcription phosphorylés par p38 sont ATF1/2/6, Sap1, CHOP, p53 Elk-1, MEF2A/C ou NFAT (Raingeaud et al, 1995) (Hazzalin et al, 1996) (Raingeaud et al, 1996) (Tan et al, 1996) (Janknecht & Hunter, 1997; Thuerauf et al, 1998) (Huang et al, 1999; Price et al, 1996; Wang & Ron, 1996).

Le KO de p38 $\alpha$  est létal à jE=10,5-12,5 du fait d'un défaut de développement du placenta et de l'angiogenèse (Tableau 7) (Mudgett et al, 2000). Concernant les KO des autres isoformes  $\beta/\gamma/\delta$ , et le double KO  $\gamma/\delta$ , aucun phénotype n'a pu être décrit. Egalement le KO d'une isoforme ne semble pas affecter l'activité kinase des autres p38. En conclusion, seule p38 $\alpha$  semble jouer un rôle critique au cours du développement et peut compenser l'absence d'une autre isoforme (Beardmore et al, 2005) (Sabio et al, 2005).

#### Les c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinases (JNK)

La classe des JNKs fait également partie des MAPKs activées par le stress cellulaire (ou SAPK) comme p38. Après avoir identifié les kinases ERK, rapidement l'idée qu'il existe une autre voie de signalisation dans les MAPKs émergea. En effet, l'administration de cycloheximide (inhibiteur de la synthèse protéique) chez des rats, induit une phosphorylation du facteur ribosomal S6. Cette phosphorylation est due à l'activation de p70S6K par phosphorylation sur ses résidus sérine/thréonine. L'hypothèse était alors que p70S6K était un substrat de ERK. Or ERK est incapable de phosphoryler p70S6K *in vitro* suggérant qu'une nouvelle sérine/thréonine kinase est impliquée dans ce mécanisme. La kinase purifiée à partir de foies perfusés au cycloheximide possédait un poids moléculaire de 54 kDa et montra une capacité à phosphoryler la protéine MAP2 *in vitro*. Elle fut alors dénommée pp54MAP2 kinase (Kyriakis & Avruch, 1990).

Par la suite les 2 isoformes de cette protéine : p46 et p54, furent purifiées par chromatographie d'affinité sur une protéine de fusion GST-c-jun (Hibi et al, 1993).

JNK1 fut isolée par 2 groupes différents en 1994 : Kyriakis *et al.* et Derijard *et al.* (Kyriakis et al, 1994) (Derijard et al, 1994). Puis, la même année, Sluss *et al.* (Sluss et al, 1994) identifia une seconde isoforme de JNK : JNK2. Enfin, les analyses de biologie moléculaire ont pu démontrer qu'il existait une troisième isoforme : JNK3. Trois gènes différents sont à l'origine de l'expression de ces trois isoformes de JNK. Si JNK1 et 2 sont ubiquistes, en revanche l'expression de l'isoforme JNK3 est restreinte au niveau du cerveau, du cœur et du testicule

(Derijard et al, 1994; Kyriakis & Avruch, 2001) (Davis, 2000; Gupta et al, 1996). Ces 3 kinases possèdent plus de 85% d'identité et toutes comportent un motif de phosphorylation TPY (Thr-Pro-Tyr) dans leur boucle d'activation. De plus de nombreux épissages alternatifs peuvent donner jusqu'à dix messagers matures et donc protéines différentes (Tournier et al, 1999). Il a été démontré que ces épissages avaient lieu entre les sous domaines IX et X ainsi qu'au niveau des extrémités C-term de JNK1/2/3. Ainsi 12 polypeptides ont pu être identifiés. Il apparaît que ces isoformes diffèrent par leurs affinités de substrats (Gupta et al, 1996) (Kallunki et al, 1994; Kyriakis & Avruch, 2001).

Le modèle animal KO pour JNK1 est viable, mais comporte des anomalies au niveau des processus d'apoptose et de la réponse immunitaire du fait d'un défaut de cellules T. Il présente également une moindre résistance à l'insuline en réponse à un régime "High Fat", due à l'absence de phosphorylation répressive de IRS1 (Tableau 8) (Constant et al, 2000) (Sabio et al, 2008). Il existe 2 modèles de souris KO pour JNK2. Ces animaux sont viables, mais présentent des défauts d'activation des cellules T dus à une sous production d'IFN $\gamma$  (Sabapathy et al, 1999) (Yang et al, 1998b). Le KO de JNK2 aurait également un rôle protecteur contre le diabète de type 1 (Jaeschke et al, 2005) (Wagner & Nebreda, 2009). Ceci démontre qu'au delà de leurs similarités de séquence et de leurs voies d'activation communes, ces 2 kinases régulent des mécanismes moléculaires et des fonctions physiologiques différents.

Le modèle animal KO pour JNK3 est également viable mais présente des défauts dans les mécanismes d'apoptose. En effet, l'invalidation de ce gène protège les cellules neuronales de l'hippocampe contre la toxicité et l'apoptose cellulaire induite par le glutamate. La phosphorylation de c-jun et l'activité AP-1 dépendante s'en retrouvent alors réduites. Ces données ont permis de conclure que JNK3 jouerait un rôle important dans l'apoptose neuronale au niveau cérébral (Bogoyevitch et al, 2004; Yang et al, 1997). Alors que les souris JNK1/3<sup>-/-</sup> et JNK2/3<sup>-/-</sup> restent viables, les souris doubles KO JNK1/2 meurent à jE=11,5 du fait d'un défaut d'apoptose au niveau du tube neural (Kuan et al, 1999) (Sabapathy et al, 1999). Ceci a permis de démontrer que les JNK1/2 jouent un rôle essentiel au niveau développement du cerveau alors que JNK3 semble être impliquée dans l'apoptose induite dans ce tissu (Yang et al, 1997) (pour revue : (Aouadi et al, 2006)).

## **1.2. Les MAPKs « atypiques »**

Cette sous famille des MAPKs comprend les kinases ERK3/4/7 et NLK. Elle est la moins étudiée tant au niveau des mécanismes d'activation que de ses fonctions physiologiques.

MAPK	Phenotype	Disease and cancer model
MAPK8 <sup>-/-</sup> (JNK1)	Thin epidermis, T cell differentiation defects	Hepatitis resistant (Con A), Liver cancer reduced (DEN), Skin cancer increased (DMBA and TPA), Gastric cancer reduced (MNU)
MAPK9 <sup>-/-</sup> (JNK2)	Keratinocyte hyperplasia, T cell differentiation defects	Hepatitis resistant (Con A), Liver cancer not affected, Skin cancer reduced (DMBA and TPA)
MAPK10 <sup>-/-</sup> (JNK3)	Resistance to excitotoxic, neuronal cell death	Not determined
MAPK9 <sup>-/-</sup> -MAPK8 <sup>f/f</sup> X Alb-Cre	No phenotype	Hepatitis-no effect (ConA)
MAPK9 <sup>-/-</sup> -MAPK8 <sup>f/f</sup> X Mx-Cre	No phenotype	Hepatitis resistant (ConA)
MAPK9 <sup>-/-</sup> -MAPK8 <sup>f/f</sup> X Fabp4-Cre	Fat phenotype	Diabetes, Hepatic insulin resistance

**Tableau 8: Phénotypes des souris knock-out pour JNK.** (extrait de Wagner EF. et Nebreda AR., 2009)

Toutefois, elle est caractérisée par deux spécificités particulières. Tout d'abord, une glycine ou un glutamate peuvent remplacer la tyrosine au sein du site de phosphorylation (pour ERK3/4 et NLK). Surtout, elles n'ont pas de MAP2K connues et ne semblent donc pas être activées par la signalisation typique des MAPKs : MAP3K>MAP2K>MAPK (Coulombe & Meloche, 2007).

#### **a) ERK 3, 4 et 7**

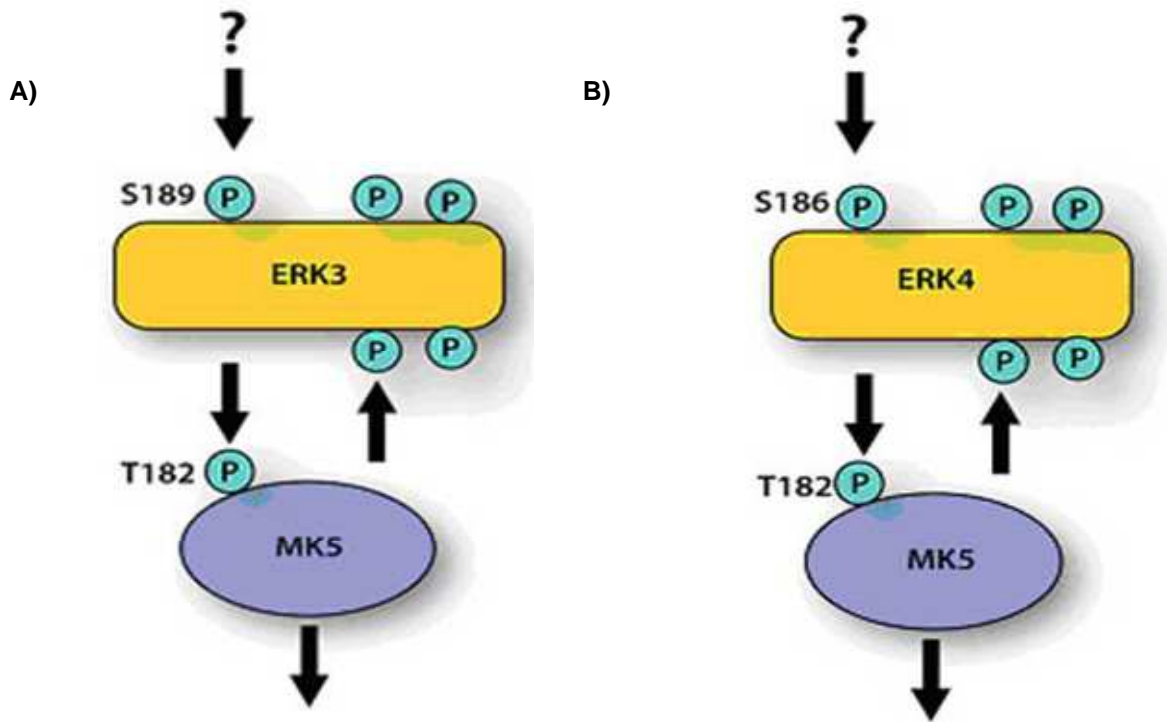
##### **ERK3/4**

ERK3 fut clonée en 1991 et identifiée par hybridation avec une sonde dirigée sur ERK1. Elle partage 43% d'homologie avec ERK2 et n'a pas d'homologue ni chez le nématode ni chez la levure. Chez l'humain, ERK3 est une protéine de 720 acides aminés (100 kDa) (Turgeon et al, 2000). Par la suite, une seconde kinase humaine, très proche de ERK3 (73% d'homologie dans le domaine kinase), a été clonée en 1992, également pour sa forte similarité de séquence avec ERK1. Cette kinase de 587 acides aminés (63 kDa), originalement désignée p63<sup>mapk</sup>, fut renommée ERK4 en accord avec la nomenclature de "l'Alliance for Cellular Signaling". Ces deux kinases sont ubiquistes (Gonzalez et al, 1992). La particularité de ces kinases ERK3/4 est située dans le motif de phosphorylation. En effet, il n'y a qu'un seul site de phosphorylation : la sérine 189 alors que la tyrosine est remplacée par une glycine (motif Ser-Glu-Gly) (Pearson et al, 2001).

Il semble que ERK3 soit localisée à la fois au niveau cytoplasmique et nucléaire. En revanche, le traitement aux agents mitotiques n'induit pas de relocalisation de cette kinase au niveau nucléaire, contrairement aux MAPKs conventionnelles. De plus cette kinase est très instable et est soumise à une dégradation rapide par le protéasome (demi-vie égale à 30-45 minutes) (Cheng et al, 1996). Il existe peu de données sur les mécanismes d'activation de ERK3. Il a été montré que cette kinase est constitutivement phosphorylée au niveau de sa boucle d'activation. La transfection d'un mutant pour le site catalytique de ERK3 est également constitutivement phosphorylé sur ce résidu suggérant l'induction de cette kinase par une MAP2K et non par autoactivation (Coulombe & Meloche, 2007).

Contrairement à ERK3, ERK4 est très stable. De plus, sa localisation est fortement cytoplasmique. Sur ces deux points précis, les propriétés de ERK4 rejoignent celles de la majorité des MAPKs.

Ces deux kinases ont une cible commune : MK5 (MAPK activated protein Kinase 5). Peu de données sont disponibles sur la fonction de cette kinase. Toutefois, le knock-down de MK5



**Figure 40: Modèles d'activation de MK5 par ERK3 et ERK4.** A) ERK3 est une MAPK avec une demi-vie courte suggérant une régulation de son activité en fonction de l'abondance de cette kinase au niveau cellulaire. Ainsi, ERK3 est régulée au niveau stabilité protéique notamment par une dégradation protéasome-dépendante B) Contrairement à ERK3, ERK4 est une protéine relativement stable. Toutefois, aucune donnée n'est disponible concernant la régulation de son expression, son activité ou son turn-over protéique. Ces deux kinases peuvent lier MK5 et l'activer par phosphorylation du résidu T182 (d'après Perander *et al.*, 2008).



provoque une forte dégradation de ERK3, suggérant un rôle de protéine chaperonne de MK5 vis-à-vis de ERK3 (Figure 40) (Perander et al, 2008).

### ERK7

ERK7 fut isolée par approche PCR dans le cerveau de rat. Un seul homologue de ERK7 fut retrouvé chez l'homme. ERK7 est majoritairement exprimée à l'âge adulte au niveau des poumons et du rein. ERK7 est une kinase de 544 acides aminés possédant 51% d'homologie avec ERK1. Son site phospho-accepteur est le même que ERK1/2/5 (motif Thr-Glut-Tyr) (Abe et al, 1999; Abe et al, 2002).

ERK7 semble être constitutivement active (phosphorylée sur TEY) et montre une affinité pour nombre de substrats de MAPK. En revanche ERK7 phosphoryle la protéine MBP sur les résidus Ser126 et Thr94, sites différents de ERK2 (Erickson et al, 1990) (Klevernic et al, 2006). Le mutant de ERK7 au niveau de son site catalytique est incapable d'être phosphorylé au niveau du motif TEY, suggérant que ERK7 puisse s'autoactiver (Abe et al, 1999) (Abe et al, 2001). Des données récentes montrent qu'ERK7 est un régulateur négatif de la voie du récepteur aux estrogènes (ER $\alpha$ ). Toutefois, si cette régulation est dépendante du site catalytique de ERK7, une phosphorylation de ER $\alpha$  par ERK7 n'a pas été démontrée (Henrich et al, 2003).

### **b) La Nemo Like Kinase (NLK)**

La kinase NLK est l'homologue de la kinase Nemo chez la drosophile ; une sérine/thréonine kinase impliquée dans le développement oculaire chez la mouche (Brott et al, 1998; Choi & Benzer, 1994). NLK est une protéine ubiquiste de 515 acides aminés, majoritairement nucléaire. Comme ERK3/4, NLK possède un seul motif de phosphorylation (motif Thr-Gln-Glu) (Brott et al, 1998; Coulombe & Meloche, 2007).

NLK est activée par la voie Wnt-1, l'IL6, et le TGF- $\beta$  (Kanei-Ishii et al, 2004; Kojima et al, 2005; Ohkawara et al, 2004; Smit et al, 2004).

De nombreuses publications impliquent la MAP3K : TAK1 et sa sous-unité régulatrice dans l'activation de NLK. Egalement, les travaux de Kanei-Ishii *et al.* proposent que la kinase HIPK2, une cible connue de TAK1, puisse phosphoryler NLK et ainsi jouer le rôle MAP2K spécifique de NLK (Kanei-Ishii et al, 2004). Toutefois, trois observations empêchent de conclure sur cette fonction de HIPK2: i) l'interaction directe entre NLK et HIPK2 n'est pas clairement établie, ii) le site de phosphorylation supposé de NLK par HIPK2 n'est pas défini, iii) si TAK1 peut bien phosphoryler HIPK2 *in vitro*, en revanche cette phosphorylation n'est

pas associée à une augmentation de l'activité kinase de HIPK2 sur NLK (Coulombe & Meloche, 2007) (Ishitani et al, 1999). De ce fait, les mécanismes d'activation de NLK restent encore méconnus.

Les premiers substrats de NLK identifiés furent des membres de la famille des TCF/LEF, facteurs terminaux de la voie WNT, comme LEF1 et TCF4 (Hurlstone & Clevers, 2002; Ishitani et al, 2003). Les animaux KO pour NLK meurent à la dernière semaine de gestation à cause d'un défaut de croissance, et de problèmes neurologiques. Ces souris présentent aussi une lymphopénie, et une différenciation anormale des cellules stromales de la moelle osseuse (Kortenjann et al, 2001).

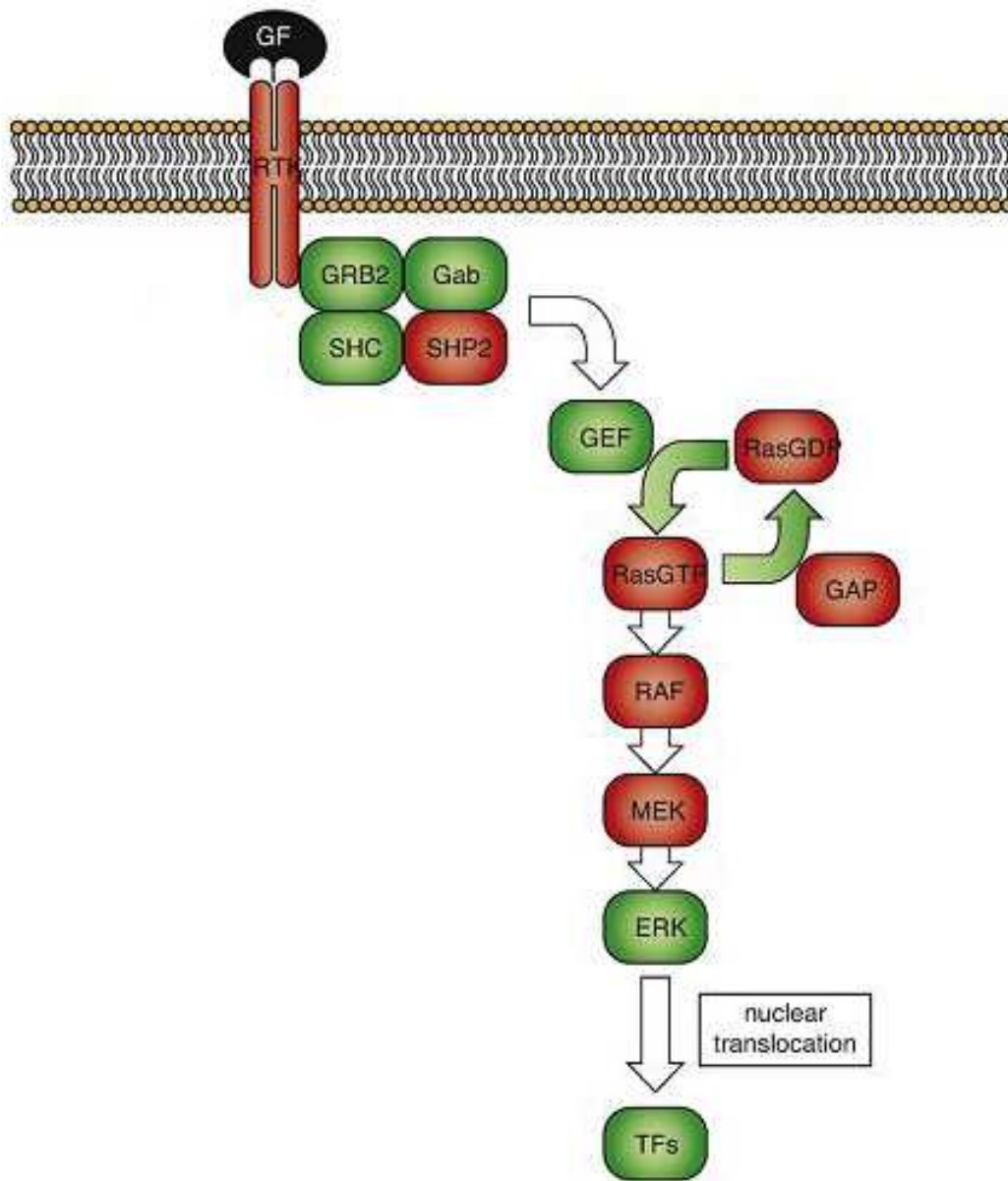
## **2. Activation des MAPKs**

Comme peu de données sont disponibles sur les mécanismes de régulation des MAPKs atypiques, nous nous focaliserons sur ceux des MAPKs conventionnelles.

### **2.1. Activation de ERK1/2**

#### **a) Activation par les récepteurs Tyrosine Kinase**

La signalisation par la voie ERK est souvent associée à la prolifération cellulaire en réponse aux facteurs de croissance. Ceci explique que la plupart des études concernent l'activation d'ERK par la voie des récepteurs tyrosine kinase. En réponse à la fixation de facteurs de croissance, d'hormones ou cytokines, les récepteurs vont dimériser, provoquant une phosphorylation mutuelle des résidus tyrosine intracellulaires par le site catalytique du domaine kinase intrinsèque. Cette phosphorylation va servir d'ancrage pour des protéines adaptatrices : Shc, Gab, et Grb2. Grb2 est constitutivement associé à SOS (protéine de type : guanine nucleotide exchange factor) (Figure 41). Le recrutement membranaire de SOS provoque l'échange de GDP pour un GTP d'une petite protéine G : Ras. Une fois activée, Ras va alors recruter la sérine/thréonine MAP3K : Raf. Après activation, Raf va alors phosphoryler les MAP2K cytoplasmiques spécifiques de la voie ERK : MEK1 et 2. A leur tour, MEK1/2 phosphoryleront ERK1/2 (Avruch, 1998; Marais et al, 1995; Marshall, 1995; Mor & Philips, 2006) (Karreth & Tuveson, 2009; Repasky et al, 2004). Cette MAPK pourra phosphoryler de nombreux substrats cytosoliques comme p90S6K (RSK1/2) ou alors gagner le noyau pour phosphoryler les facteurs de transcription incluant SP1, E2F, ELK1, AP1 ou ATF2 (Ouwens et al, 2002) (Murphy & Blenis, 2006; Yoon & Seger, 2006) (Murphy & Blenis, 2006).



**Figure 41: La voie de signalisation Ras/Raf/MEK/ERK.** La liaison d'un facteur de croissance (GF) aux récepteurs tyrosine kinase (RTK) induit le recrutement de protéines adaptatrices (Gbr2, Shc, Gab et Shp2) et de guanine exchange factors (GEF). Ces dernières activent Ras (RasGTP) qui va à son tour activer Raf . Ce dernier phosphoryle MEK1/2. Cette MAP2K va activer ERK1/2. Ces MAPK ont des substrats cytosoliques mais peuvent aussi transloquer au niveau nucléaire pour activer un programme de transcription par l'intermédiaire des facteurs de transcription (TFs) (d'après Karreth et Tuveson *et al.*, 2009).

## **b) Activation par les Récepteurs Couplés aux Protéines G**

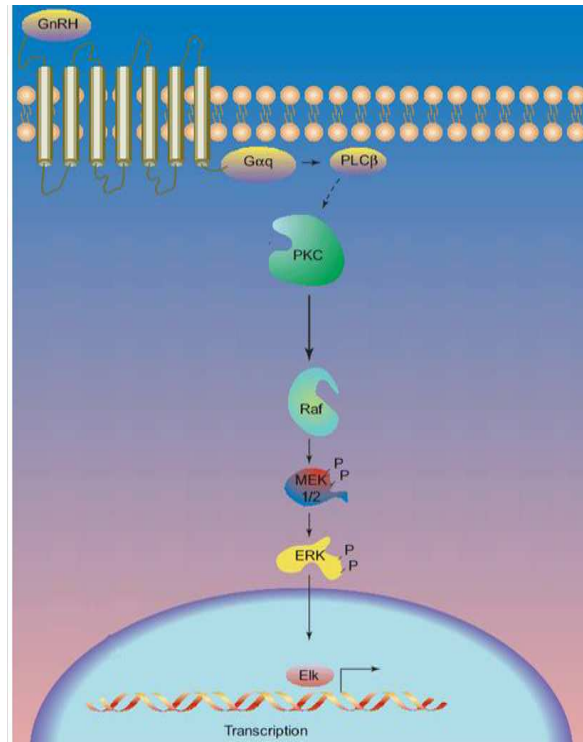
La voie ERK peut être également activée par l'intermédiaire des RCPG (Récepteurs Couplés aux Protéines G). Les RCPG sont une superfamille de récepteurs à 7 domaines transmembranaires, communément utilisés par les médiateurs extracellulaires pour aboutir à la phosphorylation de ERK1/2. La fixation du ligand sur le récepteur induit un changement de sa conformation et favorise l'interaction de celui-ci avec un ou plusieurs hétérotrimère de protéines G ( $G\alpha$ ,  $G\beta$ , et  $G\gamma$ ). Ceci induit un échange de GDP en GTP au niveau de  $G\alpha$ . Cette protéine va alors être relarguée au niveau du cytoplasme et va moduler l'activité effectrices d'enzymes comme la phospholipase C, l'adenylate cyclase ou certains canaux ioniques, régulant ainsi l'activité de kinases dépendantes d'un second messager comme la PKA (cAMP-dependent protein kinase) ou la PKC (protéine kinase C). On voit alors le rôle central que joue la protéine  $G\alpha$  recrutée. Ainsi, selon son type, les cascades de signalisation induites pourront différer.

Il existe 4 familles de protéines  $G\alpha$  connues pour moduler l'activation de ERK1/2 :  $Gai/o$ ,  $Gas$ ,  $Gaq/11$  et  $G\alpha12/13$ . Ces isoformes de  $G\alpha$  formeront un hétérotrimère avec les sous-unités  $G\beta$  et  $G\gamma$  (Pierce et al, 2002).

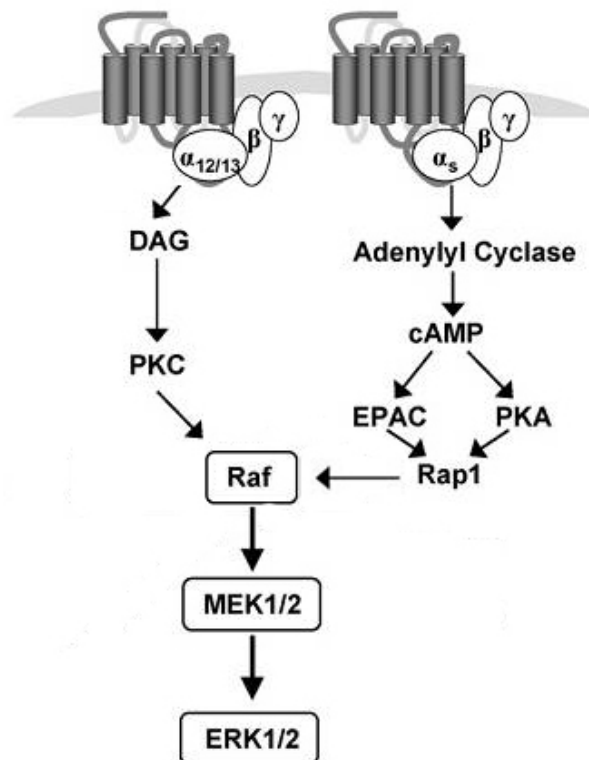
La stimulation de ERK1/2 par  $Gaq/11$  a notamment été décrite dans le cadre d'un traitement à l'hormone impliquée dans la synthèse et le relargage de LH et de FSH au niveau adénohypophysaire : la GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone) (Figure 42). Cette activation passe par l'intermédiaire de la phospholipase  $C\beta$  ( $PLC\beta$ ) qui va provoquer la génération d'inositol 1,4,5 triphosphate ( $IP3$ ) et de diacylglycerol ( $DAG$ ). Ceci va avoir pour conséquence la mobilisation de  $Ca^{2+}$  et l'activation des kinases PKC et de la protéine Raf qui va induire la cascade de phosphorylation de ERK1/2 par MEK1/2 (Dobkin-Bekman et al, 2006; Mulvaney & Roberson, 2000; Mulvaney et al, 1999; Naor et al, 2000; Roberson et al, 2000; Schnabel et al, 2000; Zhai et al, 2005).

$G\alpha12/13$  peuvent également moduler l'activité de ERK par l'intermédiaire de la production de  $DAG$  par la phospholipase A2, avant d'activer la voie ERK1/2 par l'intermédiaire de la PKC (Figure 43) (Frye, 1992; Rozengurt, 2007).

$Gas$  modulent aussi la phosphorylation de ERK1/2 par la production d'AMPc via l'adénylate cyclase (Figure 43). Cette production induit deux voies conduisant à l'activation de la GTPase Rap1 : i) la voie dépendante de l'AMPc aboutissant à l'activation de la PKA. Celle-ci va phosphoryler Src qui va alors recruter C3G pour stimuler Rap1, ii) l'accumulation d'AMPc va activer la protéine EPAC, un guanine nucleotide exchange factor (GEF) spécifique de Rap1.



**Figure 42: Activation de ERK par la voie de signalisation du récepteur à la Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH).** La liaison du GnRH à son récepteur couplé à une protéine Gαq active la phospholipase Cβ (PLCβ). Cette activation induit la production d'IP3 et DAG provoquant la mobilisation de Ca<sup>2+</sup> et activant en conséquence la PKC. Cette kinase va induire l'activation d'éléments communs à la signalisation des RTK : Raf>MEK1/2>ERK1/2 (d'après Nor et al., 2000).



**Figure 43: Activation de ERK par la voie de signalisation des récepteurs couplés aux protéines Gα12/13 ou Gαs.** L'activation des récepteurs couplés aux protéines Gα12/13 induit la production de diacylglycérol (DAG) activant la kinase PKC. De même, l'activation des récepteurs couplés aux protéines Gαs induit la phosphorylation de Rap1 soit par EPAC soit par la PKA. Dans ces types de signalisation, la conséquence sera l'activation de la voie Raf>MEK1/2>ERK1/2 (d'après May LT. et Hill SJ., 2008).

Dans les deux cas, Rap1 va stimuler Raf et induire l'activation de ERK1/2 (Goldsmith & Dhanasekaran, 2007; Schmitt & Stork, 2002)

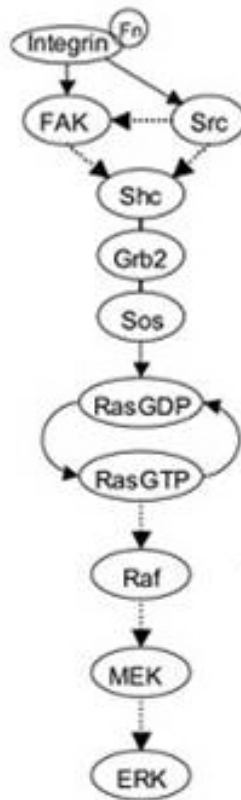
Gai/o module également la voie ERK. Des études sur cellules CHO montrent qu'un traitement avec du 5-oxo-ETE, ligand naturel du récepteur TG1019 couplé à la protéine Gai/o, induit l'activation dose-dépendante de ERK1/2 (Hosoi et al, 2005). Une autre étude a montré que la stimulation mécanique des ostéoblastes nécessite l'activation d'une voie Gai→ERK→Cbfa1/Runx2→osteocalcine (Chen et al, 2003). Enfin, l'équipe de H.Kurose a décrit une hausse de l'échange de GTP sur les protéines Gai et Gao en réponse à un traitement de cardiomyocytes primaires à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. L'activation de ces protéines G corrèle avec une hausse de l'activité de la voie ERK (Nishida et al, 2000). Il est à noter que d'autres stimuli comme des neuropeptides ou des hormones peuvent réguler l'activité de ERK (pour revue : (May & Hill, 2008))(Mochizuki et al, 1999).

### **c) Activation par les intégrines**

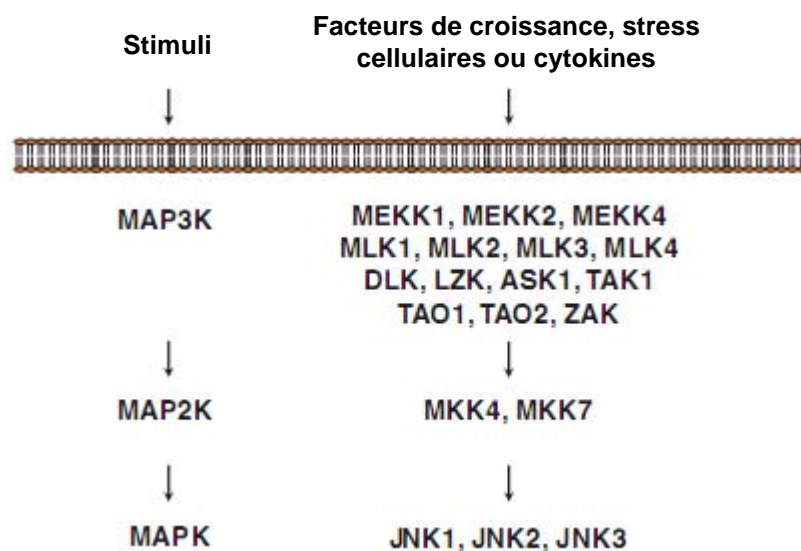
Enfin, la voie ERK peut également être activée par l'interaction de certaines intégrines avec la matrice extracellulaire. L'adhésion cellulaire (les intégrines α5β1 liant la fibronectine) induit l'activation de la voie FAK (Focal Adhesion Kinase) et l'activation de Src. Ces deux voies convergent vers une même voie de signalisation : Shc>Grb2>Sos>Ras>Raf>MEK>ERK (Figure 44) (Yee et al, 2008) (Aplin et al, 1998; Asthagiri et al, 1999; Danen & Yamada, 2001; Renshaw et al, 1997)

## **2.2. Activation de JNK**

Les kinases JNKs sont également activées par double phosphorylation au niveau du consensus TPY. Deux protéines kinases ont été identifiées comme activant directement JNK : MKK4 et MKK7 (Figure 45) (Lu et al, 1997) (Tournier et al, 1997). Alors que MKK4 a été décrite comme pouvant activer les deux voies des SAPKs (p38 et JNK), MKK7 semble spécifique à la kinase JNK. De plus, des analyses *in vitro* ont démontrées que MKK4 aurait une affinité particulière pour la phosphorylation du résidu tyrosine alors que MKK7 a une affinité plus particulière pour la phosphorylation du résidu thréonine de JNK1 (Lawler et al, 1998). Enfin, différents épissages alternatifs ont été décrits pour ces deux MAP2K, produisant trois isoformes différentes de MKK4 et six pour MKK7 (Tournier et al, 1999). Au niveau MAP3K, de nombreuses kinases ont été décrites comme activatrices de la voie JNK. On retrouve notamment : MEKK1/2/4, MLK1-4, Tpl2, DLK, LZK, TAK1, ZAK, TAO1/2, ou ASK1/2 (Figure 45)(Weston et al, 2002)



**Figure 44: Activation de ERK par la voie de signalisation des intégrines.** L'activation des intégrines par la fibronectine (Fn) provoque l'induction de la FAK et de Src. Ces deux signalisations activent la voie Shc>Grb2>SOS>Ras>Raf>MEK1/2>ERK1/2 (extrait de Yee K.L. *et al.*, 2008).

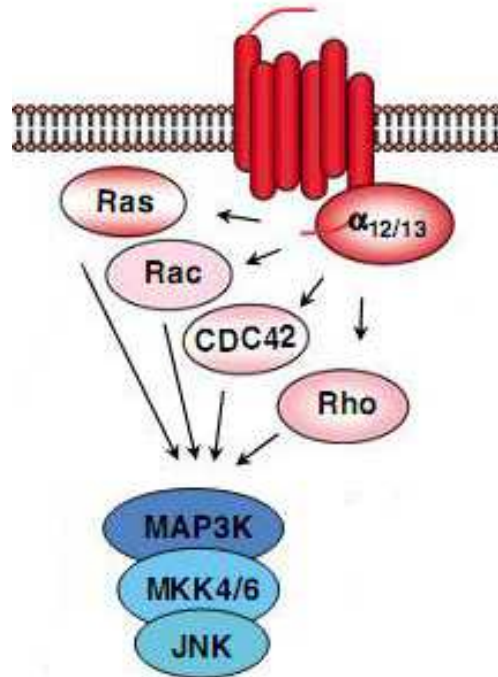


**Figure 45: Modules MAPK des voies de signalisation JNK-dépendantes.** L'activation des MAPK JNK nécessite leur phosphorylation par une des MAP2K : MKK4 ou MKK7. En amont de ces deux kinases, de nombreuses MAP3K ont été identifiées (extrait de Dhanasekaran D.N. et Reddy E.P., 2008).

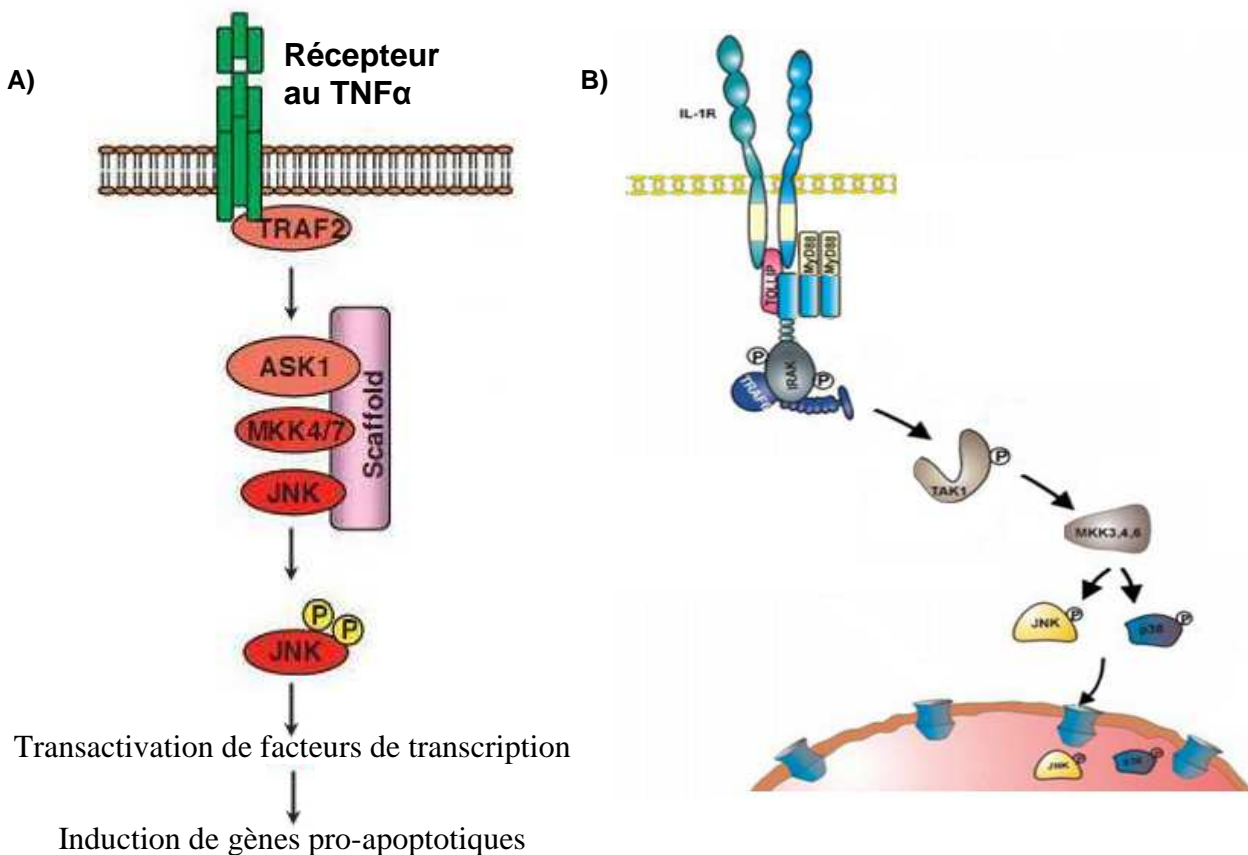
En amont du module MAPK, les RCPG sont connus pour activer également la voie JNK (Figure 46). Cette activation a essentiellement été décrite par l'étude de la classe des Gα12. Cette sous-famille de protéines G regroupe les protéines Gα12 et Gα13. Elles possèdent 65% d'homologie de séquence et sont connues pour être de forts inducteurs de la transformation cellulaire. La manière dont ces protéines G activent JNK semble dépendante du type cellulaire et du contexte physiologique. Ainsi, des expériences de transfection d'un allèle constitutif de Gα12 active JNK via Ras dans des cellules NIH3T3, Rac1 dans les cellules d'astrocytomes 1321N ou Cdc42 dans des COS-7. En revanche, toutes ces GTPases transmettent le signal via la MAP3K : MEKK1, puisqu'un dominant négatif de cette kinase inhibe l'activation Gα12-dépendante de JNK. Toutefois, Gα12/13 peuvent aussi induire la voie JNK par l'intermédiaire des MAP3K : ASK1, MEKK2 ou 4, suggérant l'implication d'autres GTPases comme Rho ou Ras. Enfin, Gα12 semble préférentiellement activer la MAP2K : MKK7 alors que Gα13 stimulerait plus favorablement MKK4 (pour revue : (Goldsmith & Dhanasekaran, 2007)).

JNK peut également être activée par l'intermédiaire de récepteurs tyrosine kinase. C'est notamment le cas du récepteur orphelin Ror2. Les travaux d'Oishi *et al.* (Oishi et al, 2003) démontrent que ce récepteur active la phosphorylation de JNK par l'intermédiaire de Wnt5a. Egalement, les cytokines comme le TNFα ou l'interleukine 1 (IL-1) peuvent aussi activer la signalisation de JNK après la liaison à leurs récepteurs, notamment dans l'activation de la voie extrinsèque de l'apoptose. Par exemple, la fixation du TNFα soluble à son récepteur (TNFR1) va provoquer le recrutement des protéines TRADD, TRAF2 et RIP (Figure 47A). Ce complexe va activer les MAP3K : ASK1 et MEKK1 qui vont phosphoryler MKK4 et MKK7. A leurs tours, ces deux kinases vont activer JNK et p38. L'effet physiologique de l'activation de JNK dans ce contexte va dépendre de la durée d'activation. Ainsi une stimulation courte ou modérée de JNK est associée à la survie cellulaire alors qu'une activation prolongée mène à l'induction de l'apoptose par le TNFα (Dhanasekaran & Reddy, 2008). L'IL-1 peut aussi induire la voie JNK. La fixation de cette molécule sur son récepteur (IL-1R1) provoque le recrutement des protéines IRAK, TRAF6 et MyD88 (Figure 47B). Celles-ci vont induire l'activation de la MAP3K : TAK1 qui va à son tour phosphoryler les MAP2K : MKK3/4/6. Ceci induit l'activation des deux SAPKs : JNK et p38 qui vont transloquer au niveau nucléaire et phosphoryler les facteurs de transcription c-jun ou c-Fos (Janssens & Beyaert, 2003). Les molécules comme TRAIL, CD40 ou Fas-L sont également de forts inducteurs de la voie JNK.





**Figure 46: Activation de JNK par la voie de signalisation des récepteurs couplés aux protéines G $\alpha$ 12/13.** L'activation des récepteurs couplés aux protéines G $\alpha$ 12/13 induit l'activation de GTPases (Ras, Rac, Cdc42 ou Rho) activant par la suite le module MAPK spécifique des JNKs (d'après Goldsmith Z.G. et Dhanasekaran D.N., 2007).



**Figure 47: Activation de JNK par les voies de signalisation activées par le TNF $\alpha$  et l'IL-1.** A) L'activation du récepteur au TNF $\alpha$  induit le recrutement d'un module MAPK : ASK1>MKK4/7>JNK. Ceci va permettre l'induction de la transcription de gènes pro-apoptotiques (d'après Dhanasekaran D.N. et Reddy E.P., 2008). B) La fixation de l'IL-1 sur son récepteur induit l'activation du module TAK1>MKK3/4/6>JNK/p38 (d'après Janssens S. et Beyaert R., 2003).

### **2.3. Activation de p38**

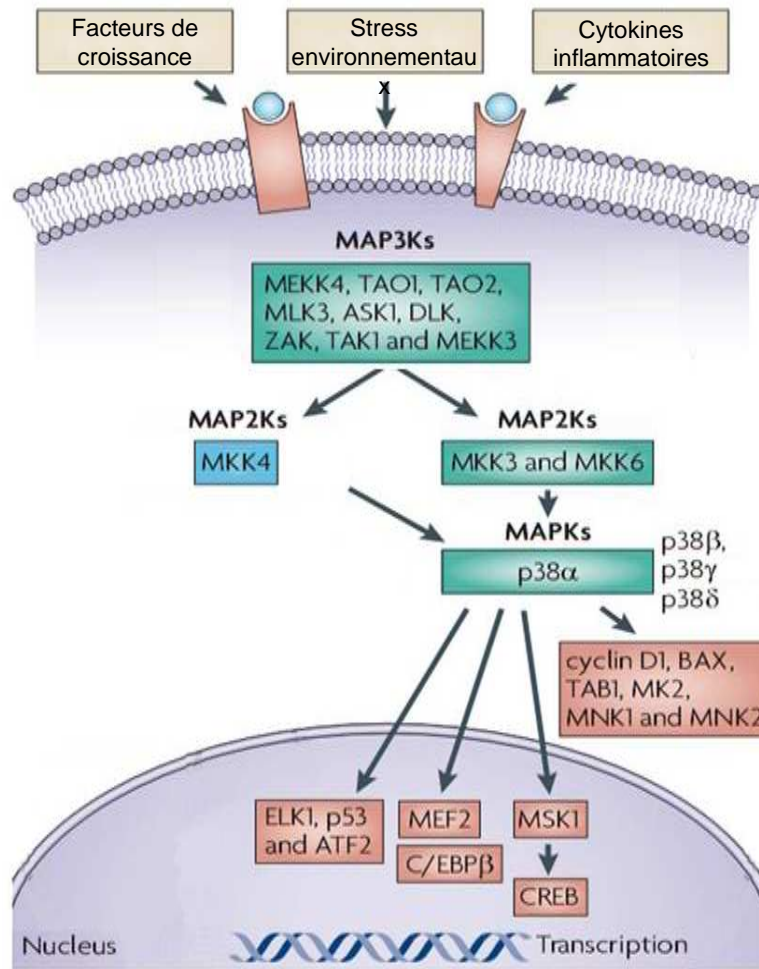
L'activation de p38 passe par la double phosphorylation de son motif Thr-Gly-Tyr. Cette phosphorylation peut être réalisée par deux MAP2K majeures : MKK3 et MKK6 (Raingeaud et al, 1996) (Derijard et al, 1995) L'activation par l'une ou l'autre de ces kinases peut varier selon le type cellulaire. Par exemple, certains auteurs ont montré que MKK3 est l'activateur majoritaire dans les cellules mésengiales alors que d'autres ont décrit que MKK6 semble l'être plutôt dans les thymocytes (Tanaka et al, 2002) (Wang et al, 2002). Si MKK6 semble phosphoryler toutes les isoformes de p38, en revanche, il apparaît que MKK3 ait plus d'affinité pour p38 $\alpha$  et  $\beta$  (Enslin et al, 2000). Egalement, il existe un carrefour entre la voie de p38 et JNK par l'intermédiaire de la MAP2K : MKK4, cette kinase pouvant également activer p38 (Derijard et al, 1995). Ainsi, les fibroblastes invalidés pour MKK4 sont incapables d'activer p38 en réponse au TNF $\alpha$ , à l'IL1 (mécanismes décrits ci-dessus) ou à un choc osmotique (Ganiatsas et al, 1998). De plus, plusieurs MAP3Ks ont été identifiées comme étant activatrices de MKK3/6. On peut notamment citer TAK1, ASK1, DLK, Tpl2, TAO1/2, MEKK4, MLK2/3 ou SPRK (Figure 48) (pour revue (Chen et al, 2001)).

Tout comme JNK, l'activité de p38 peut être modulée par les protéines G. C'est particulièrement le cas des RCPG muscariniques et  $\beta$ -adrénergiques (Lopez-Ilasaca, 1998). Egalement, certains articles ont démontré que la protéine G $\alpha_q$  stimule la signalisation p38 par l'intermédiaire des MAP2Ks : MKK3/6 (Yamauchi et al, 2001).

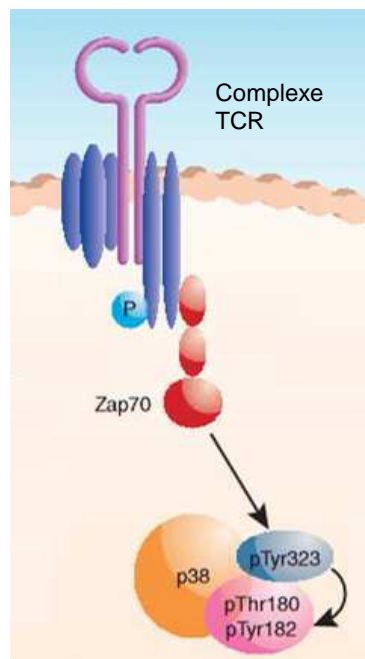
Enfin d'autres types d'autoactivation de p38 ont été décrits. Premièrement, dans le cadre de cellules T stimulées au niveau du TCR (T Cell antigen Receptor), la tyrosine kinase recrutée au niveau du récepteur : Zap70, phosphoryle p38 sur un résidu non-canonique : Tyr323. Cette phosphorylation va provoquer l'autophosphorylation de p38 au niveau du motif Thr-Gly-Tyr (Figure 49) (Mittelstadt et al, 2005; Rudd, 2005). Deuxièmement, la protéine TAB1 (Transforming growth factor- $\beta$ -Activated protein 1 Binding protein 1) a été identifiée comme pouvant lier uniquement l'isoforme p38 $\alpha$  lors d'ischémie cardiaque ou de la mise en jeu de mécanismes immunologiques. La liaison de TAB1 va provoquer l'autophosphorylation de p38 $\alpha$  sur le motif Thr-Gly-Tyr (Kim et al, 2005) (Tanno et al, 2003)

## **3. Mécanismes de régulation de l'activité des MAPKs**

Les MAPKs sont des voies de signalisation dont la spécificité d'action est dépendante de la kinase activée, de la durée de son activation et du substrat qu'elle va phosphoryler. Ceci est



**Figure 48: Modules MAPK des voies de signalisation p38-dépendantes.** L'activation des MAPKs p38 nécessite leur phosphorylation soit par une des MAP2K spécifiques de cette voie : MKK3 ou MKK6, soit par la MAP2K commune avec la voie JNK : MKK4. En amont de ces trois kinases, de nombreuses MAP3K ont été identifiées (Extrait de Wagner E.R. et Nebreda A.R., 2009).



**Figure 49: Activation alternative de p38 par le récepteur au T-Cell Receptor (TCR.** Dans les cellules T, la liaison du ligand au récepteur TCR induit une augmentation de l'activité kinase de Zap70. Ceci provoque la phosphorylation de p38 sur le résidu tyr323, suivi d'une autophosphorylation de cette kinase au niveau de sa boucle d'activation (thr180/tyr182) (Extrait de Rudd C.E., 2005).

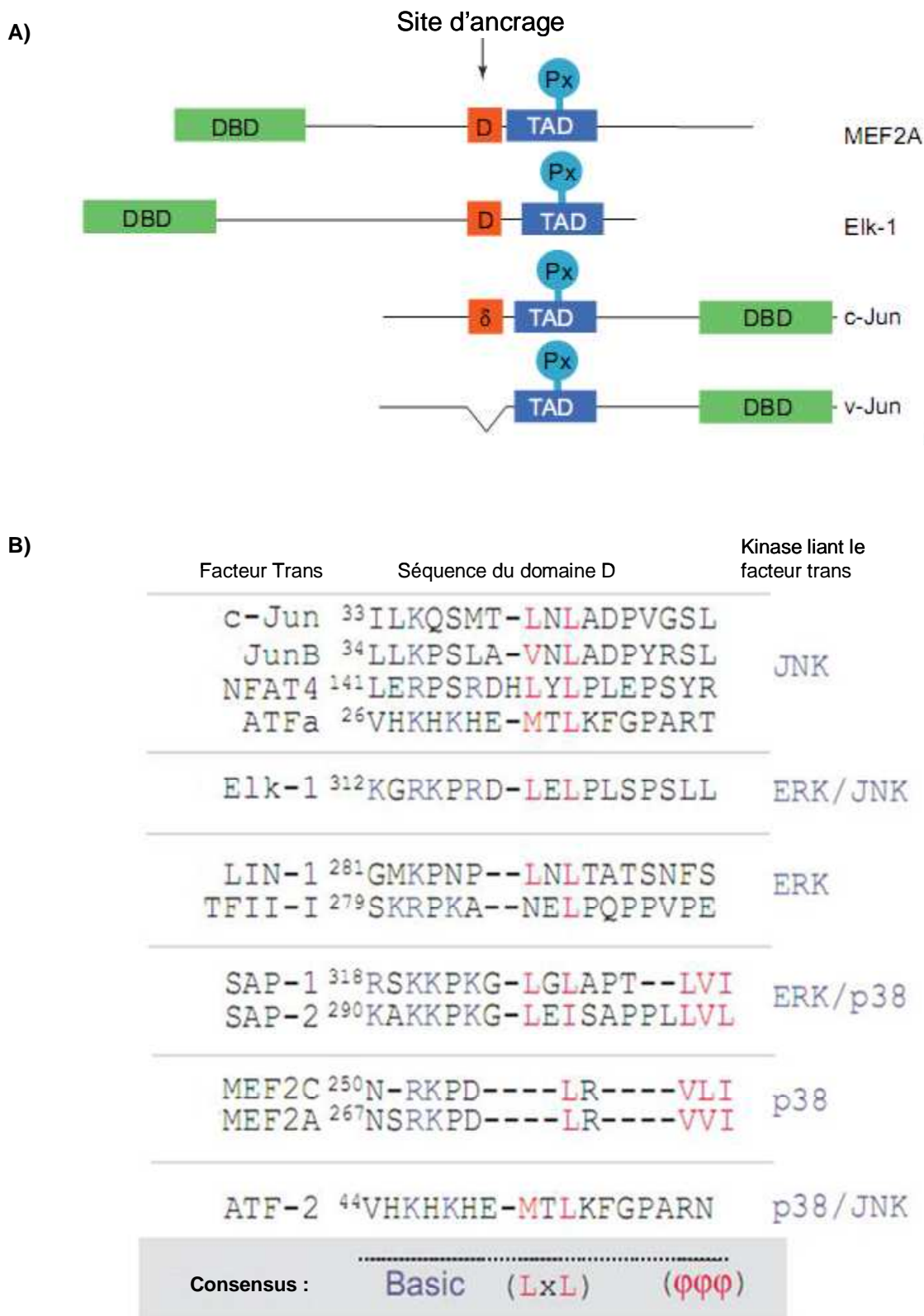
également valable à chacun des échelons de la voie. Plusieurs mécanismes régulent ce processus, et ce, à différents niveaux du signal : i) Au niveau du module MAPK, des protéines d'échafaudage vont être chargées de faciliter le contact entre les différents éléments de ce module. Le choix et la spécificité de ces protéines va donc conditionner le type de kinases recrutées et donc l'impact du signal au niveau de la transcription. ii) Au niveau de la durée d'activation des kinases, celle-ci est dépendante de leurs degrés de phosphorylation. Par conséquent, les protéines à activités phosphatases spécifiques des MAPKs vont être de puissants régulateurs de ce type de signalisation. iii) Enfin, le dernier niveau de régulation de la voie des MAPKs fait intervenir l'affinité entre ces différents partenaires (substrats, kinases, phosphatases, protéines d'échafaudage). Cette spécificité du substrat est régulée par les différents types de domaines d'interaction (ou sites d'ancrage) permettant une liaison entre les MAPKs et les régulateurs de leurs activités. Chacun de ces trois niveaux de régulation des MAPKs vont être décrits dans l'ordre suivant : les sites d'ancrage, les phosphatases et enfin les protéines d'échafaudage.

### **3.1. Les sites d'ancrage (ou docking-site) des MAPKs**

Les sites d'ancrage permettent une interaction directe entre la kinase et son substrat. Ceci a pour but de colocaliser ces deux protéines et donc de faciliter et de diriger les mécanismes de phosphorylation. Plusieurs sites de liaison ont pu être identifiés au sein même des séquences des MAPKs. Des domaines similaires ont aussi été retrouvés dans les différentes protéines régulatrices de l'activité de ces kinases.

#### **a) Sites d'ancrage des facteurs de transcription à la kinase**

Le premier site d'ancrage identifié fut le domaine  $\delta$  de c-jun. En effet, Cette séquence spécifique de 27 acides aminés est absente dans le variant oncogénique de c-jun : v-jun. Cette délétion inhibe l'interaction de ce facteur avec JNK démontrant ainsi l'importance de ce site, et notamment du motif qu'il contient : Lys-X-X-Lys-X<sub>4</sub>-Leu-X-Leu, dans la transduction du signal (Adler et al, 1992). Par la suite, l'étude des séquences d'autres facteurs de transcription impliqués dans les voies des MAPKs a permis d'identifier plusieurs dérivés du domaine  $\delta$  et furent alors communément appelés domaine D (Figure 50). Le consensus pour ce type de domaine est Leu-X-Leu précédé de 3 à 5 acides aminés basiques. Ce type de motif fut ainsi retrouvé dans les séquences d'autres facteurs de transcription cibles de ERK et JNK issus des familles ETS, MADS ou à domaine "leucine zipper" comme : c-jun, JunB, Elk-1 ou ATF2. En revanche, certains substrats spécifiques de p38 (comme MEF2A et C) contiennent trois



**Figure 50: Homologies de séquences entre les sites d'ancrage à la kinase des facteurs de transcription activés par les MAPKs.** A) Les différents facteurs de transcription cibles des MAPKs possèdent de multiples structures protéiques conservées, notamment le site d'ancrage à la kinase (domaine D), hormis pour v-jun. B) L'alignement des séquences des domaines D de différents facteurs de transcription cibles des MAPKs indiquent un consensus : Acides aminés basiques-L-X-L-Acides aminés hydrophobiques. TAD : domaine de transactivation, Px : sites de phosphorylation par les MAPKs, DBD : domaine de liaison à l'ADN, En rouge : Acides aminés hydrophobiques, En bleu : Acides aminés basiques, φ : représente un acide aminé hydrophobique (Extrait de Sharrock A.D. *et al.*, 2000).

résidus hydrophobiques à la place du motif Leu-X-Leu. Ces variations de séquences peuvent donc contribuer à la spécificité du substrat d'une MAPK vis-à-vis d'une autre (Figure 50) (Sharrocks et al, 2000) (Biondi & Nebreda, 2003).

Un dernier motif spécifique de la voie ERK a été identifié. Il s'agit du domaine DEF (Phe-X-Phe). Ce domaine a initialement été décrit comme essentiel pour le ciblage du facteur de transcription Lin1 par la kinase ERK. Par la suite, ce même motif a été retrouvé dans d'autres facteurs de transcription comme Elk-1. Si ce domaine Phe-X-Phe est nécessaire pour la transduction du signal par l'intermédiaire de ERK, en revanche, il ne modifie pas l'action des autres MAPKs. Ce motif contribue donc à la spécificité et l'affinité de ERK pour ses substrats (Sharrocks et al, 2000).

#### **b) Sites d'ancrage impliqués dans l'assemblage des modules MAPK**

La littérature rapporte que ce type de domaine D n'est pas uniquement spécifique des facteurs de transcription. Ils peuvent également jouer un rôle dans l'assemblage des modules MAPK (MAP3K>MAP2K>MAPK).

Ainsi, Grewal *et al.* (Grewal et al, 2006) ont déterminé un domaine D (Arg/Lys)<sub>2</sub>-X<sub>6</sub>-Leu/Ile-X-Leu/Ile localisé dans les séquences de MEK1/2 et MEKK3/6. Ce domaine, conservé chez la levure, permet le recrutement des MAPKs par ces MAP2Ks. La délétion de ce domaine réprime l'activation respectivement de ERK et p38. Ce même type de domaine a également été décrit dans la séquence de la MAP2K spécifique de JNK : MKK7. Dans ce cas, cette MAP2K possède trois domaines D similaires, essentiels pour l'interaction avec JNK et la transmission du signal JNK-dépendant (Ho et al, 2006). Ainsi, la plupart des MAP2Ks possèdent ce consensus à titre de domaine d'interaction avec la MAPK. Ces résultats montrent que ces sites d'ancrage sont essentiels pour la phosphorylation des MAPKs par leurs kinases en amont.

De la même manière, des expériences de mutations ponctuelles dans la séquence de ERK2 ont permis d'identifier un nouveau motif de 30 acides aminés appelé « MAPK insert ». Ce domaine apparaît comme essentiel pour l'interaction entre ERK2 et la MAP2K : MEK1. En revanche, il ne posséderait pas de fonction particulière pour l'interaction avec MNK1, RSK ou la phosphatase MKP3 (Zhang et al, 1994).

Enfin, un domaine d'ancrage a été identifié au niveau C-terminal des MAP2K : MEK1 et MKK3/4/6/7. Cette séquence de 20 acides aminés permet la liaison de ces kinases avec les MAP3Ks.

### **c) Sites d'ancrage d'autres partenaires des MAPKs**

D'autres sites d'ancrage ont été retrouvés dans les séquences de kinases substrats de ERK ou p38 (RSKs, MNK1, MSK1 ou MAPKAPK2/3), de phosphatases (MKP3/4/5) ou de protéines d'échafaudages (JIP1 ou MEK1).

Ainsi la séquence Leu-X-X-Arg-Arg suivie de résidus basiques joue un rôle important dans la liaison entre ERK et les substrats de la famille des MAPKAPK (MNK, MSK) ou RSK. Ce motif a également été retrouvé au sein de séquences de tyrosine phosphatases comme PTP-SL ou STEP (Figure 51) (Biondi & Nebreda, 2003). Les fonctions des phosphatases et des protéines d'échafaudage sont abordées ci-dessous.

## **3.2. Les phosphatases des MAPKs**

Si les MAPKs sont activées par phosphorylation, ce processus est complètement réversible. La balance de phosphorylation est assurée par la conjugaison entre les activités kinase et phosphatase. Ceci permet de réguler l'amplitude et la durée de la réponse au stimulus. Si la majeure partie des MAPKs nécessite une activation par double phosphorylation, la seule déphosphorylation d'un de ces résidus entraîne l'inactivation de la kinase. Il existe trois grandes familles de phosphatases modulant l'activité des MAPKs : les phosphatases à doubles spécificités, les tyrosine phosphatases et les sérine/thréonine phosphatases.

### **a) Les phosphatases à double spécificité (ou DUSP)**

Les DUSP (DUal Specificity Phosphatases) sont un groupe de phosphatases hétérogène ayant pour propriété de déphosphoryler les résidus phospho-thréonine/sérine et les phospho-tyrosine sur un même substrat. Des six sous-groupes composant cette classe de phosphatases, celui étant spécifique aux MAPKs : les MKP (Mitogen-activated protein Kinase Phosphatases) est indéniablement celui qui a été le plus étudié (Patterson et al, 2009). Les MKP déphosphorylent les résidus phospho-thréonine et phospho-tyrosine en même temps, inactivant ainsi la MAPK cible. (Camps et al, 2000). Cette famille possède du côté N-terminal un domaine non catalytique homologue à la phosphatase Cdc25 et un domaine catalytique phosphatase VH-1 du côté -COOH, contenant notamment le domaine His-Cys-X5-Arg, spécifique de cette classe de phosphatases (Camps et al, 2000; Keyse, 2000).

MKP1 fut la première phosphatase isolée en 1991 (Guan et al, 1991). Depuis 10 MKP ont été identifiées et ont pu être classées en trois groupes selon leurs localisations cellulaires (Tableau 9) (Dickinson & Keyse, 2006; Kondoh & Nishida, 2007; Zhan et al, 2001) :



A)	Partenaire (Phosphatase, protéines d'échafaudage)	Séquence du domaine D	Kinase liant le partenaire
	*Jip-1 <sup>152</sup>	YRPKR---PTTLNL	JNK
	*Jip-3 <sup>199</sup>	GRSRK-ERPTSLNV	
	*PTP-SL <sup>225</sup>	LQERR-GSNVSLTL	ERK
	*STEP <sup>211</sup>	LQERR-GSNVSLTL	
	*MKP3 <sup>61</sup>	IMLRRLQK-GNLPV	
	*PDE4D <sup>452</sup>	VETKKVTSSGVL	
	*MEK1 <sup>1</sup>	MKKKPTP---IQL	
	Consensus :	φ Basic LxL	
B)	Substrat cytoplasmique	Séquence du domaine D	Kinase liant le partenaire
	*Rsk1 <sup>722</sup>	LAQRR-VRKLPSTT	ERK
	*Rsk2 <sup>726</sup>	LAQRRGIKKITSTA	
	*Rsk3 <sup>720</sup>	LAQRRGMKRLTSTR	
	*Xp90Rsk <sup>801</sup>	LAQRR-VKKLPSTT	
	*Mnk1 <sup>391</sup>	LARRRALAQAGRSR	ERK/p38
	Msk1 <sup>740</sup>	LAKRRKMKTSTST	
	MAPKAP-K2 <sup>384</sup>	LLLKRRKKARALEA	p38
	MAPKAP-K3 <sup>362</sup>	LLNKRRKKQAGSSS	
	Consensus :	φ Basic	

**Figure 51: Sites d'ancrage à la kinase conservés au niveau de partenaires des MAPKs.** Les différents partenaires des MAPKs possèdent un site d'ancrage à la kinase conservé (domaine D). L'alignement des séquences de ces domaines indiquent un consensus pour **A)** les protéines partenaires des MAPKs ou **B)** pour les substrats cytoplasmiques de ces kinases. En bleu : Acides aminés basiques, φ : représente un acide aminé hydrophobique (Extrait de Sharrock A.D. *et al.*, 2000).

Gene	MKP	Trivial names	Chromosomal localization	Subcellular localization	Substrate preference	Physiological function(s)
DUSP1	MKP-1	CL100, erp, 3CH134, hVH1	5q34	Nuclear	JNK, p38, ERK	Negative regulator of immune function. Protects mice from lethal endotoxic shock. Plays a key role in metabolic homeostasis and mediates resistance to cellular stress in mouse fibroblasts.
DUSP4 DUSP2	MKP-2	Typ1, Sty8, hVH2 PAC-1	8p12-p11 2q11	Nuclear Nuclear	JNK, p38, ERK ERK, p38	Positive regulator of inflammatory responses. Knockout mice are resistant to immune inflammation
DUSP5 DUSP6	MKP-3	hVH-3, B23 Pyst1, rVH6	10q25 12q22-q23	Nuclear Cytoplasmic	ERK ERK	Negative feedback regulator of ERK2 downstream of FGFR signalling.
DUSP7 DUSP9	MKP-X MKP-4	Pyst2, B59 Pyst3	3p21 Xq28	Cytoplasmic Cytoplasmic	ERK ERK > p38	Essential for placental development and function (labyrinth formation)
DUSP8 DUSP10	MKP-5	M3/6, hVH5, HB5	11p15.5 1q41	Cytoplasmic/nuclear Cytoplasmic/nuclear	JNK, p38 JNK, p38	Functions in innate and adaptive immunity
DUSP16	MKP-7		12p12	Cytoplasmic/nuclear	JNK, p38	

**Tableau 9: Nomenclature, localisations cellulaires et fonctions physiologiques des MKPs.** (Extrait de Owens D.M. et Keyse S.M., 2007).



- expression uniquement nucléaire : MKP1/2, PAC1 et hVH3
- expression exclusivement cytoplasmique : MKP3/4, et MKP-X
- expression à la fois cytoplasmique et nucléaire : MKP5/7 et hVH5

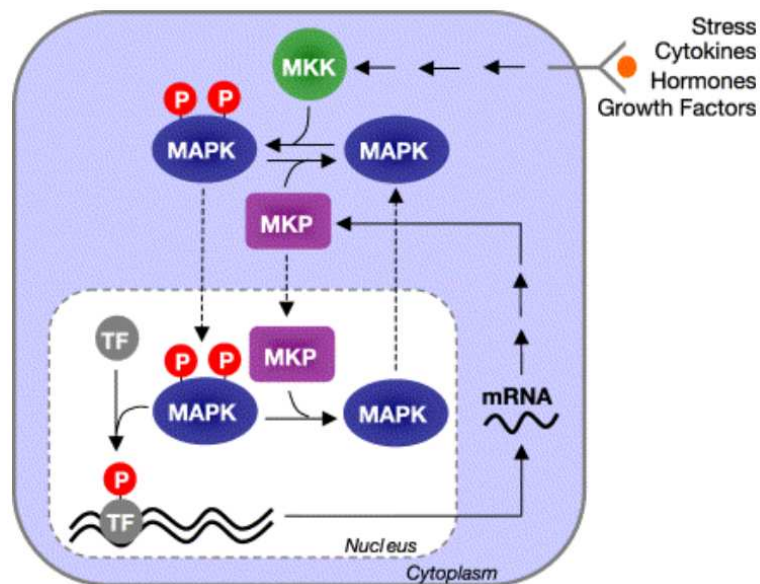
MKP1/2 peuvent déphosphoryler les trois MAPKs alors que MKP3/X et hVH3 semblent plus favorablement inactiver ERK. A l'inverse, MKP5/7 et hVH8 déphosphorylent préférentiellement les SAPK (JNK et p38) alors que PAC1 et MKP4 s'avèrent plus favorables à la déphosphorylation de ERK et p38. De plus, ces phosphatases semblent avoir une répartition tissulaire spécifique. Par exemple, PAC1 est exprimée essentiellement au niveau des cellules hématopoïétiques alors que MKP4 est exprimée dans le placenta, le rein, et le foie fœtal (Muda et al, 1997; Rohan et al, 1993).

L'expression de ces phosphatases est stimulée par les mêmes stimuli activant les MAPKs comme les cytokines, les facteurs de croissance, ou le sérum (Figure 52). Par exemple, l'ajout de sérum provoque l'activation de la voie ERK mais également l'induction des gènes codant pour les phosphatases MKP1/2. Ces phosphatases vont alors agir comme une boucle de régulation négative sur la voie ERK (Brondello et al, 1997; Farooq & Zhou, 2004). De la même manière, Ekerot *et al.* ont démontré que l'activation de la voie ERK par le FGF provoque l'induction de la transcription de MKP3 via le facteur de transcription Ets (Ekerot et al, 2008; Owens & Keyse, 2007).

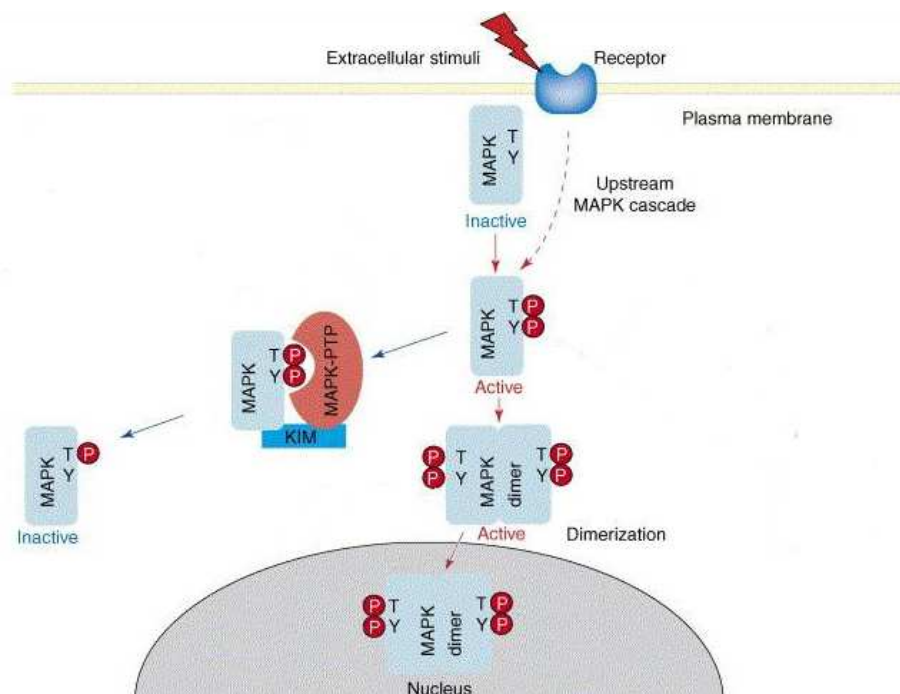
### **b) Les PTP (Protein Tyrosine Phosphatases)**

Cette famille de phosphatases déphosphoryle uniquement les résidus phospho-tyrosine (Figure 53). Il y a au moins 107 gènes différents dans le génome humain codant pour les PTP. Les analyses phylogénétiques de ces phosphatases ont permis de les classer en 18 groupes. Particulièrement, le sous groupe PTP-R7 comprend les phosphatases PTPN5, PTPN7 et PTPRR qui ont la propriété d'être des MAPK-PTP (Figure 54). Ce sous-groupe se caractérise par la présence d'un motif KIM (Kinase Interacting Motif) de 16 acides aminés permettant la liaison de la phosphatase à la MAPK. Leur localisation est soit membranaire, soit cytosolique selon l'épissage alternatif qu'elles vont subir (Barr & Knapp, 2006) (Pulido et al, 1998).

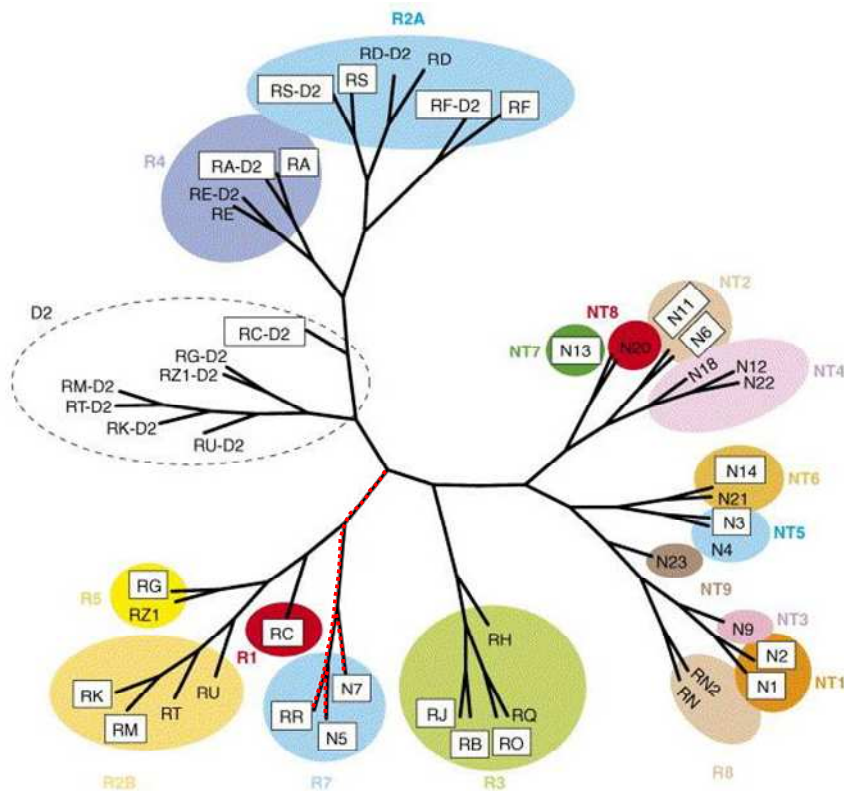
PTPN5 est une phosphatase uniquement exprimée au niveau cervical (striatum, hippocampe et cortex) (Lombroso et al, 1991). Cette phosphatase est notamment impliquée dans les processus de mise en mémoire et d'apprentissage. Suite à l'activation des récepteur NMDA par le glutamate au niveau du striatum, la voie ERK est activée ainsi que PTPN5. L'activation de la phosphatase va limiter la durée de l'état phosphorylé de ERK et sa translocation au niveau nucléaire (Paul et al, 2003).



**Figure 52: Boucle de régulation de la signalisation des MAPKs par les MKPs.** En réponse à divers stimuli, l'activation des MAPKs entraîne l'induction de gènes cibles dont ceux de MKPs spécifiques. Ceci permet la mise en place d'une boucle de régulation négative des MAPKs par leurs phosphatases (Extrait de Farooq A. et Zhou M., 2004).



**Figure 53: Schéma général de la régulation des MAPKs par les PTPs.** Après activation, les MAPKs peuvent être déphosphorylées par les PTPs au niveau du résidu tyrosine (d'après Barr A.J. et Knapp S., 2006).



**Figure 54: Arbre phylogénique des PTPs humaines.** Les PTPs sont sous-divisées en deux groupes : les receptor PTPs (groupes R1 à R8) possédant au moins un domaine intra et extracellulaire et les PTPs non-transmembranaires (groupes NT1 à NT9). Les PTPs spécifiques des MAPKs (sous-groupe R7 : PTPN5, PTPN7 et PTPRR) sont indiquées en pointillés rouges (Extrait de Barr A.J. et Knapp S., 2006).

PTPN7 est exprimée essentiellement au niveau du thymus, de la rate, et des leucocytes (Eswaran et al, 2006). Elle régule négativement la phosphorylation de ERK suite au traitement au PMA (Phorbol Myristate Acetate) ou au TCR (anti-CD3-mediated T-cell Receptor) (Gronda et al, 2001). Cette phosphatase est également surexprimée chez les patients atteints de leucémie (Zanke et al, 1994).

Enfin, PTPRR est exprimée au niveau du cartilage et du cerveau (surtout dans le cervelet). La surexpression de PTPRR dans les cellules PC12 inhibe l'activation de ERK par le NGF ou l'EGF (Ogata et al, 1999).

### **c) Les sérine/thréonine phosphatases**

Chez les eucaryotes, les sérine/thréonine phosphatases constituent une famille divisée en deux sous groupes : les PPP (PhosphoProtein Phosphatases) et les PPM (Protein Phosphatase Magnesium-dependent) qui requièrent du  $Mg^{2+}$  ou  $Mn^{2+}$  pour leurs activités. Chacun de ces sous-groupes comportent des classes d'enzymes régulant l'activité des MAPKs par déphosphorylation. Dans les PPP, les phosphatases ciblant les MAPKs sont la PP2A et PP5 alors que dans les PPM, ce sont les isoformes de PP2C ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  et  $\epsilon$ ) (Lammers & Lavi, 2007). (Klumpp et al, 2006).

#### **Les PPP régulant les voies MAPK (PP2A et PP5)**

La PP2A est une sérine/thréonine phosphatase capable de moduler la voie Ras>Raf>MEK>ERK en fonction du contexte cellulaire. Ainsi, PP2A peut s'associer à la protéine Shc, inhiber sa phosphorylation et donc la progression du signal via Ras et Raf (Ugi et al, 2002). Egalement, la surexpression d'un dominant négatif *in vivo* de la sous-unité catalytique de PP2A augmente la phosphorylation de MEK1/2 (Junttila et al, 2008). Enfin, elle peut s'associer avec la MAP2K : MKK3 afin de réguler négativement la voie p38 (Prickett & Brautigan, 2007)

PP5 est une deuxième sérine/thréonine phosphatase issue du groupe des PPP et capable de moduler les voies de signalisation MAPK dépendantes. Cette enzyme peut cibler Raf et ASK1 (Hinds & Sanchez, 2008). Ainsi après stimulation par l'EGF, PP5 peut se lier à Raf-1. Cette liaison a pour conséquence la déphosphorylation de Raf-1 au niveau de la sérine 338 rendant cette protéine instable et inhibant la voie MEK/ERK (Golden et al, 2008). Egalement PP5 peut lier ASK1 après traitement de cellules à l' $H_2O_2$ . Cette liaison entraîne, *in vitro*, la déphosphorylation de cette MAP3K sur la thréonine 845 (Morita et al, 2001). Récemment, Gentile *et al.* (Gentile et al, 2006) ont pu montrer que PP5 module également la voie de

signalisation de l'hormone thyroïdienne par l'intermédiaire des GTPases Rac et Rho. Enfin, des expériences de double hybrides ont montré que PP5 pouvait interagir avec les protéines G : Gα12 et Gα13. Cette interaction suggère une régulation au niveau membranaire des activités GTPases et donc des voies en aval de celles-ci (Golden et al, 2008).

### Les PPM régulant les voies MAPK

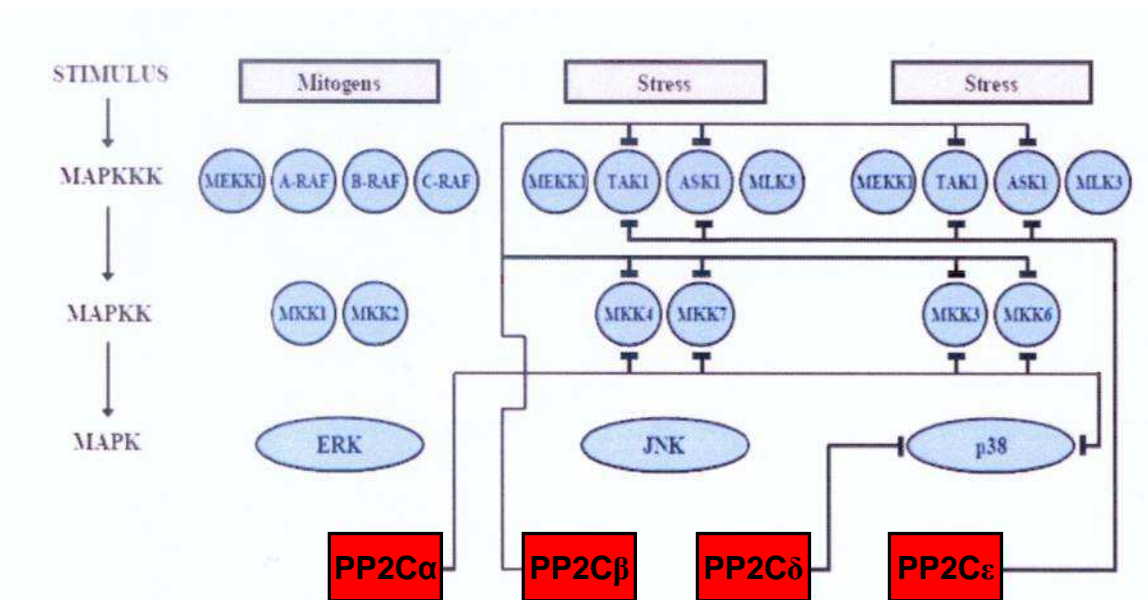
La famille des PP2C constitue une classe de sérine/thréonine phosphatases qui nécessitent du  $Mn^{2+}$  et/ou du  $Mg^{2+}$  pour être actives, et qui sont insensibles à l'acide okadaïque, un inhibiteur puissant des sérine/thréonine phosphatases. Il existe 22 isoformes de PP2C issues de l'expression de 16 gènes différents. Seules les isoformes α, β, ε et δ sont connues pour réguler les MAPKs (Klumpp et al, 2006) (Tamura et al, 2006) (Lammers & Lavi, 2007).

PP2Cα est une isoforme plutôt considérée comme spécifique des voies des SAPK (p38 et JNK). Elle n'affecterait pas l'activité de la voie ERK. Ainsi, concernant la signalisation JNK-dépendante, elle est connue pour déphosphoryler les MAP2K spécifiques de la voie JNK : MKK4 et MKK7. Egalement, concernant la voie p38, une surexpression de PP2Cα provoque une inhibition de la phosphorylation des MAP2K : MKK3 et MKK6, suite à un choc osmotique. Par ailleurs, Takekawa *et al.* ont pu coprécipiter PP2Cα avec p38, suggérant que cette phosphatase peut également cibler directement cette MAPK (Figure 55) (Lammers & Lavi, 2007; Takekawa et al, 1998).

PP2Cβ semble être également spécifique des voies des SAPK. Ainsi la surexpression de PP2Cβ provoque une répression de la phosphorylation de p38 et de JNK à l'état basal comme induit. Cette inhibition est due à une réduction du statut phosphorylé de MKK3 et MKK6 (voie p38) et de MKK4 et MKK7 (voie JNK). Enfin, cette phosphatase cible également une MAP3K : TAK1 connue pour activer les voies MKK6>p38 et MKK4>JNK. En revanche, la voie ERK n'est en rien affectée par la surexpression de PP2Cβ (Lammers & Lavi, 2007).

L'isoforme PP2Cδ (ou WIP1) a été décrite comme une phosphatase spécifique de p38. Notamment, le traitement aux UV entraîne une activation de p38 qui va alors phosphoryler p53. PP2Cδ interagit directement avec p38 pour déphosphoryler son résidu Thr180. Cette activité réduit ainsi l'activité de p38 et donc la phosphorylation d'une de ces cibles en réponse aux UV : p53 (Lu et al, 2008; Takekawa et al, 2000).

PP2Cε a été décrite comme un régulateur négatif des MAP3K : ASK1 et TAK1, réduisant en conséquence l'activité p38 et JNK. Ainsi la surexpression de PP2Cε induit un défaut de phosphorylation de ASK1 sur la Thr845, en réponse au traitement à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Saito et al, 2007;



**Figure 55: Schéma général de la régulation des MAPKs par les PP2C.** (d'après Lammers T. et Lavi S., 2007).

Tamura et al, 2006). Concernant TAK1, une surexpression de PP2C $\epsilon$  inhibe l'interaction de TAK1 avec MKK4 ou MKK6. De plus, la surexpression d'un dominant négatif de cette phosphatase augmente l'activité kinase de TAK1 (Li et al, 2003).

### **3.3. Les protéines d'échafaudage**

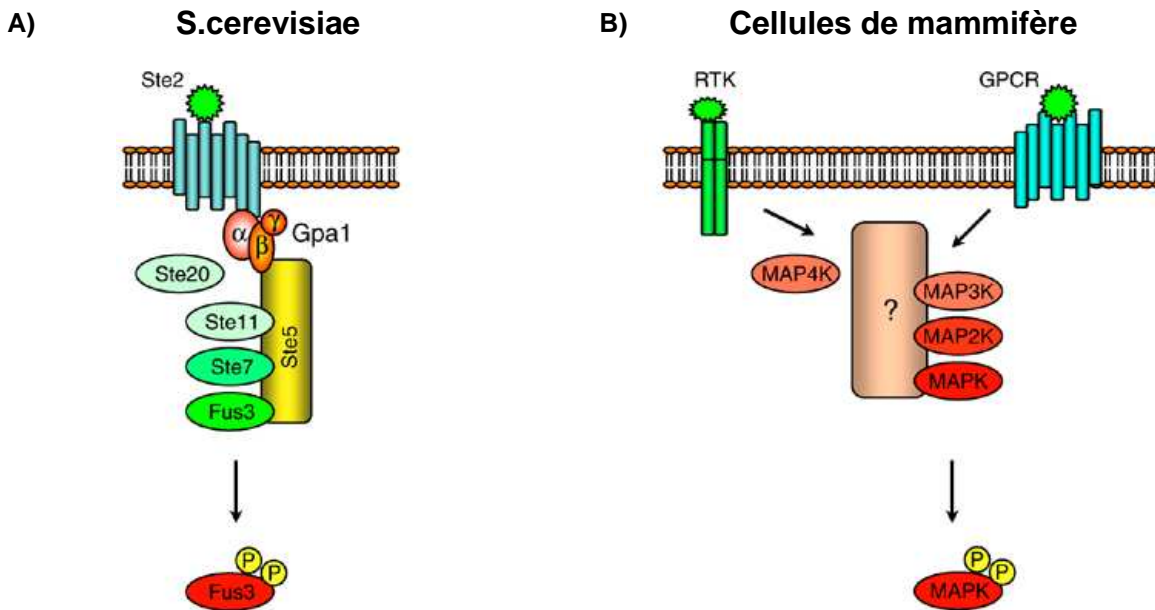
L'activation de la cascade de signalisation par les MAPKs requière une interaction fine entre les kinases et leurs substrats respectifs. Cette organisation est assurée par les protéines d'échafaudage (ou scaffold proteins), permettant ainsi l'obtention d'un module MAPK fonctionnel. Les premières études concernant ces protéines ont été réalisées chez la levure pour identifier les régulateurs de la signalisation des phéromones Ste11/Ste7/Fus3. Ces études ont mis en évidence que la protéine Ste5 est chargée de l'interaction entre ces trois kinases et les protéines G activées lors de la fixation des phéromones sur son récepteur (Yoshioka, 2004). Chez les mammifères, selon la voie de signalisation activée, la mise en jeu de ces protéines peut varier. Ainsi, certaines protéines d'échafaudage seront spécifiques de la voie ERK et d'autres des SAPKs (Figure 56) (Dard & Peter, 2006).

#### **a) Les protéines d'échafaudage de la voie ERK**

Plusieurs "scaffold proteins" ont été identifiées pour réguler la voie ERK.

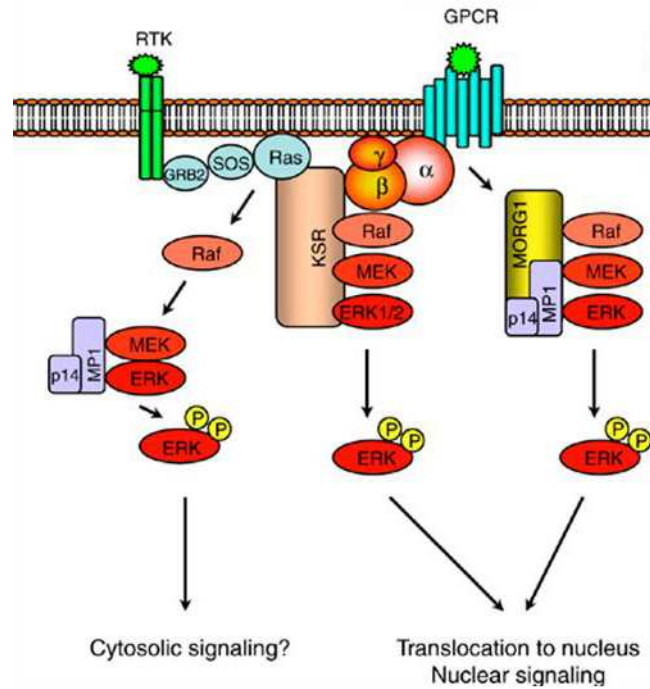
La première, KSR (Kinase Suppressor of Ras) fut originellement découverte comme étant un régulateur négatif de la voie Ras chez la drosophile. Chez les mammifères, il existe deux homologues de KSR : KSR1 et 2, dont les fonctions semblent diverger selon le type cellulaire. Toutefois ces deux protéines peuvent interagir avec les protéines G $\beta$  et  $\gamma$ , Raf, MEK1/2 et ERK1/2 (Figure 57) (Dhanasekaran et al, 2007). Ces protéines possèdent un domaine kinase non fonctionnel. En revanche, il permet la fixation constitutive de MEK. Lors de l'activation de Ras, on observe la liaison de ERK et Raf à KSR. Cette liaison s'accompagne d'une relocalisation de ce complexe au niveau de la membrane plasmique nécessitant la déphosphorylation de KSR au niveau de la sérine 392. La cascade de phosphorylation va avoir lieu et phospho-ERK sera libéré pour transloquer au niveau nucléaire. Les animaux KSR1 $^{-/-}$  sont viables et ne démontrent pas de phénotype particulier suggérant des fonctions redondantes entre les deux isoformes de KSR (Morrison & Davis, 2003).

Une autre protéine a été identifiée comme favorisant l'assemblage de la voie ERK est MEK-partner 1 (MP1) (Figure 57). Cette petite protéine de 13 kDa, favorise la liaison et l'activation de MEK1/ERK1, et n'interagit pas avec les kinases MEK2 et ERK2. De plus, la surexpression de MP1 provoque une augmentation de l'interaction ERK1/MEK1, de la phosphorylation de

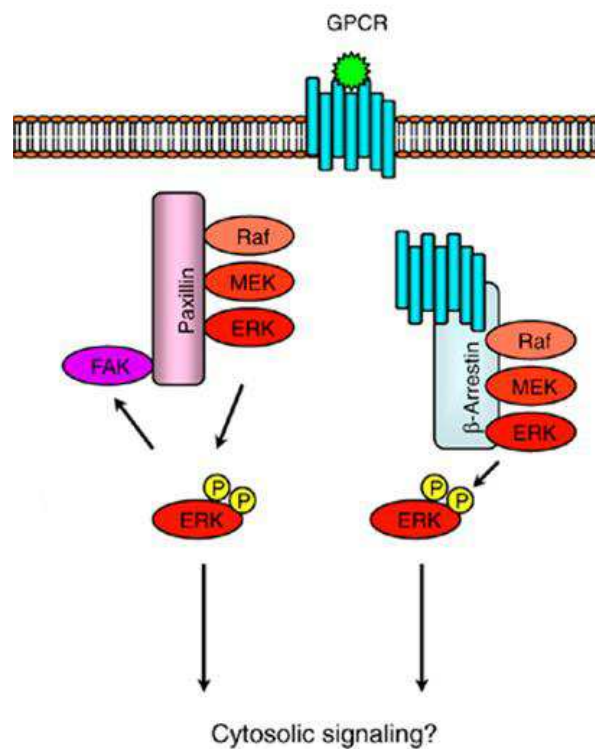


**Figure 56: Schéma de la régulation des MAPKs par les protéines d'échafaudage chez la levure et les cellules de mammifère. A)** Chez la levure, la réponse aux phéromones requière la mise en place d'un module MAPK Ste11>Ste7>Fus3. Ce module est stabilisé par une protéine d'échafaudage Ste5. **B)** Ce même schéma est conservé chez les mammifères dans les réponses MAPK-dépendantes aux récepteurs tyrosine kinase ou couplés aux protéines G (extrait de Dhanasekaran D.N. *et al.*, 2007).





**Figure 57: Protéines d'échafaudage impliquées dans la régulation de la signalisation ERK-dépendante, exemples de MP1, KSR et MORG1 (extrait de Dhanasekaran D.N. *et al.*, 2007).**



**Figure 58: Protéines d'échafaudage impliquées dans la régulation de la signalisation ERK-dépendante, exemples de la Paxillin et β-arrestin (extrait de Dhanasekaran D.N. *et al.*, 2007).**

ERK1, et de l'activité transcriptionnelle de Elk-1. MP1 possède une localisation au niveau de la membrane cytoplasmique des endosomes. Cette localisation s'explique par une interaction constitutive de MP1 avec p14, une protéine endosomale. Cette liaison MP1-p14 est essentielle pour une activation complète. En effet, la déplétion de p14 par siRNA provoque le relargage de MP1 au niveau cytoplasmique et une inhibition de la signalisation ERK (Morrison & Davis, 2003).

MORG1 est une protéine de 35KDa pouvant également moduler la signalisation de ERK. Cette protéine fut isolée par sa capacité à lier MP1. MORG1 peut s'associer directement avec plusieurs éléments de la voie ERK : Raf-1, b-Raf, MEK1/2 et ERK1/2 (Figure 57) (Vomastek et al, 2004). La surexpression de MORG1 induit une suractivation de la voie ERK en réponse au sérum. A l'inverse, son extinction atténue cette réponse. Plus intéressant, MORG1 semble avoir un rôle différent selon le type de stimuli. En effet, si cette "scaffold protein" augmente la signalisation ERK-dépendante en réponse au LPA ou aux esters de phorbol, en revanche elle n'affecte en rien la réponse à l'EGF. Ceci suggère un rôle de MORG1 dans la signalisation des récepteurs couplés aux protéines G plutôt que dans celle des récepteurs à tyrosine kinase. Toutefois, on ne connaît pas la finalité de l'interaction MORG1/MP1. Comme ces deux protéines peuvent co-localiser au niveau de structures vésiculaires, il est possible que cette coopération influe sur la stabilité du signal à des niveaux sub-cellulaires précis (Dhanasekaran et al, 2007).

La paxillin est une protéine de 68 kDa localisée au niveau des foci d'adhésion et modulant la réponse FAK-dépendante à l'Hepatocyte Growth Factor (HGF). Dans les cellules quiescentes, la paxillin est constitutivement liée à MEK. Cependant, après traitement à l'HGF, Src activée va phosphoryler la paxillin sur la tyrosine 118, provoquant le recrutement de ERK et Raf et donc le déclenchement de la cascade de phosphorylation. ERK activée pourra à son tour phosphoryler d'autres protéines du complexe au niveau du foci d'adhésion, dont la paxillin, induisant le recrutement de la FAK à ce niveau cellulaire (Figure 58) (Dhanasekaran et al, 2007).

La  $\beta$ -arrestin joue un rôle dans la désensibilisation des signaux provenant des RCPG et activant ERK (Figure 58). Ainsi après stimulation par un agoniste d'un de ces récepteurs, la  $\beta$ -arrestin transloque du cytoplasme vers la membrane et interagit directement avec le RCPG activé. Ceci a pour conséquence le découplage du récepteur vis-à-vis des protéines G inhibant ainsi la transduction du signal. Les trois isoformes de ERK ont ainsi été retrouvées dans le complexe RCPG/ $\beta$ -arrestin. C'est notamment le cas après activation des récepteurs AT1aR

(Angiotensin Type 1a Receptor) ou PAR2 (Protease Activated Receptor 2). De multiples indices démontrent que la  $\beta$ -arrestin contribue à l'activation RCPG dépendante de ERK. Ainsi la surexpression d'un dominant négatif de la  $\beta$ -arrestin diminue l'activation de ERK. A l'inverse, sa surexpression dans des cellules traitées avec de l'angiotensine (agoniste de AT1aR) augmente l'activation mais aussi la séquestration de ERK au niveau membranaire, inhibant la réponse transcriptionnelle au stimulus. En revanche, on ne connaît pas le mécanisme d'assemblage de ce complexe (Morrison & Davis, 2003).

Enfin, MEKK1 joue, en plus de sa fonction de MAP3K, un rôle de "scaffold protein". Cette hypothèse repose sur les travaux de Karandikar *et al.* (Karandikar et al, 2000) qui ont montré une interaction constitutive de MEKK1 avec Raf-1, MEK1 et ERK2.

### **b) Les protéines d'échafaudage de JNK**

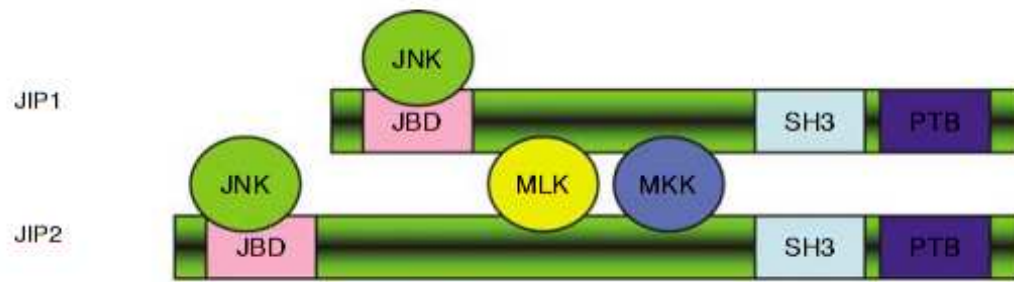
De la même manière, la signalisation de JNK est régulée par des protéines d'échafaudage.

Les plus étudiées sont les JIPs (JNK Interacting Proteins). Cette famille comporte 4 protéines JIP1, 2, 3 et 4 issues de la transcription de quatre gènes différents. Ces isoformes de JIP ont été séparées en deux sous groupes sur la base de leurs structures protéiques : JIP1 et 2 possèdent des domaines SH3 (Src Homology domain 3) et PTB (domaine de liaison aux phospho-tyrosines) alors que JIP3 et 4 ont des domaines "coil-coiled" et transmembranaire (Koushika, 2008). JIP1 et 2 étant proches structurellement, leurs fonctions sont similaires (Figure 59). JIP1/2 peut assembler spécifiquement les trois intermédiaires du module MAPK: MLK/MKK7/JNK, facilitant l'activation de JNK. Il a également été montré que JIP2 peut moduler la voie p38 en liant MKK3, p38 $\alpha$  et p38 $\gamma$  (Figure 60). Egalement, les JIP1/2 peuvent lier la phosphatase MKP7, supposant que ces protéines d'échafaudage peuvent réguler négativement la voie des SAPKs.

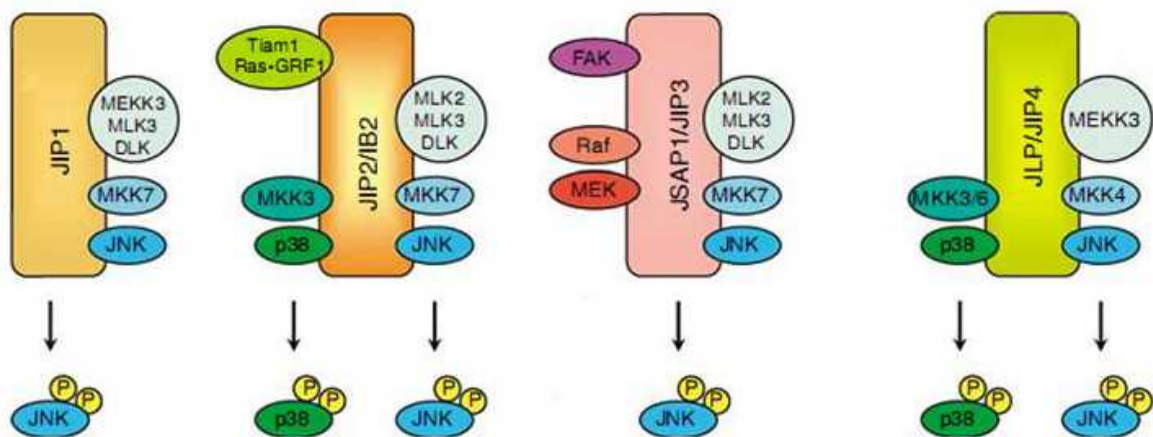
JIP3 (ou JSAP1) a été identifiée comme étant un partenaire de JNK1. Toutefois, cette protéine peut aussi interagir avec MEKK1, MLK3, ASK1, MKK4/7. Au niveau des MAPKs, JIP3 s'associe préférentiellement à JNK3 plutôt qu'à JNK1/2 (Figure 60).

Enfin, la protéine d'échafaudage JIP4 peut lier les kinases MEKK3, MKK4 et JNK. Toutefois, les études fonctionnelles de JIP4 semblent indiquer que cette protéine régule plus favorablement la voie p38 (Figure 60) (Lee et al, 2002; Morrison & Davis, 2003; Thompson et al, 2001).

D'autre part comme pour la signalisation ERK, la  $\beta$ -arrestin 2 peut moduler la signalisation de JNK. Elle interagit avec JNK3 et ASK1. Elle peut également lier MKK4 mais de façon



**Figure 59: Structures protéiques des protéines d'assemblage JIP1 et 2.** Ces deux protéines d'assemblage ont des structures similaires, leur permettant de recruter les kinases de chaque niveau du module MAPK. Le domaine JBD permet la liaison de la MAPK : JNK alors que le domaine PTB reconnaît les phospho-tyrosines. SH3 : Src Homology domain 3, PTB : Phosphotyrosine-Binding domain, JBD : JNK-Binding Domain (extrait de Dhanasekaran D.N. *et al.*, 2007).



**Figure 60: Rôles des protéines d'assemblage de la famille des JIPs.** Quatre JIPs ont été identifiées. Parmi elles, JIP1 et 3 sont spécifiques de la voie JNK. En revanche, JIP2 et 4 peuvent réguler à la fois la signalisation de JNK et de p38 (extrait de Dhanasekaran D.N. *et al.*, 2007).

indirecte. La  $\beta$ -arrestin 2 est nécessaire pour l'activation de JNK3 après stimulation du récepteur de l'angiotensine 2.

### **c) Les protéines d'échafaudage de p38**

Concernant la régulation de la voie p38, peu de protéines d'échafaudage ont été identifiées. Néanmoins, de récentes données indiquent que les JIP2 et JIP4 peuvent interagir avec p38 (Figure 60). JIP2 peut lier les isoformes  $\alpha$  et  $\gamma$  de p38 ainsi que sa MAP2K : MKK3. Par exemple, Buchsbaum *et al.* (Buchsbaum et al, 2002) ont réalisé des expériences de transfections de plasmides codant pour des allèles constitutivement actifs de Tiam1 et Ras-GRF1, deux "guanines exchange factors" pouvant activer p38 par l'intermédiaire de la voie Rac>MLK3>MKK3. Cette induction est potentialisée par la cotransfection d'un plasmide JIP2, favorisant l'assemblage de cette voie de signalisation et donc l'activation de p38.

Concernant JIP4, l'équipe de R. Davis a montré que cette protéine module plus favorablement la voie p38 (Figure 60). La surexpression de JIP4 n'affecte pas l'activité de JNK alors qu'elle potentialise celle de p38. Ils ont pu mettre en évidence une interaction directe entre p38 $\alpha$  et ASK1. Cependant, ils n'ont pas pu détecter d'interaction entre JIP4 et une MAP2K malgré que la surexpression de JIP4 soit incapable de potentialiser l'activité de p38 dans les cellules MKK3 $^{-/-}$  ou MKK6 $^{-/-}$ . Ceci suggère que ces MAP2Ks ainsi que JIP4 sont indispensables à la transduction du signal par la voie p38 (Kelkar et al, 2005)

Enfin, une protéine d'échafaudage spécifique de la voie p38 a récemment été identifiée par le laboratoire de GL. Jonhson : l'OSM (Osmosensing Scaffold for MKK3). L'extinction de OSM par siRNA atténue l'activation de p38 par un choc osmotique. A l'inverse, des expériences de FRET montrent une augmentation de l'interaction OSM/MKK3 lors du traitement au sorbitol (Uhlik et al, 2003).

## **4. Rôles des MAPKs dans la réponse un déficit en acides aminés indispensables**

Peu de données traitant du rôle des MAPKs dans un contexte de carence en acides aminés indispensables sont disponibles dans la littérature. De plus, si certains articles rapportent que ce stimulus puisse activer les voies ERK et JNK, certaines fonctions de ces kinases demandent d'être approfondies. Je vais donc m'attacher à décrire les résultats clairs traitant du rôle de ces deux kinases dans la réponse à la carence en acides aminés.

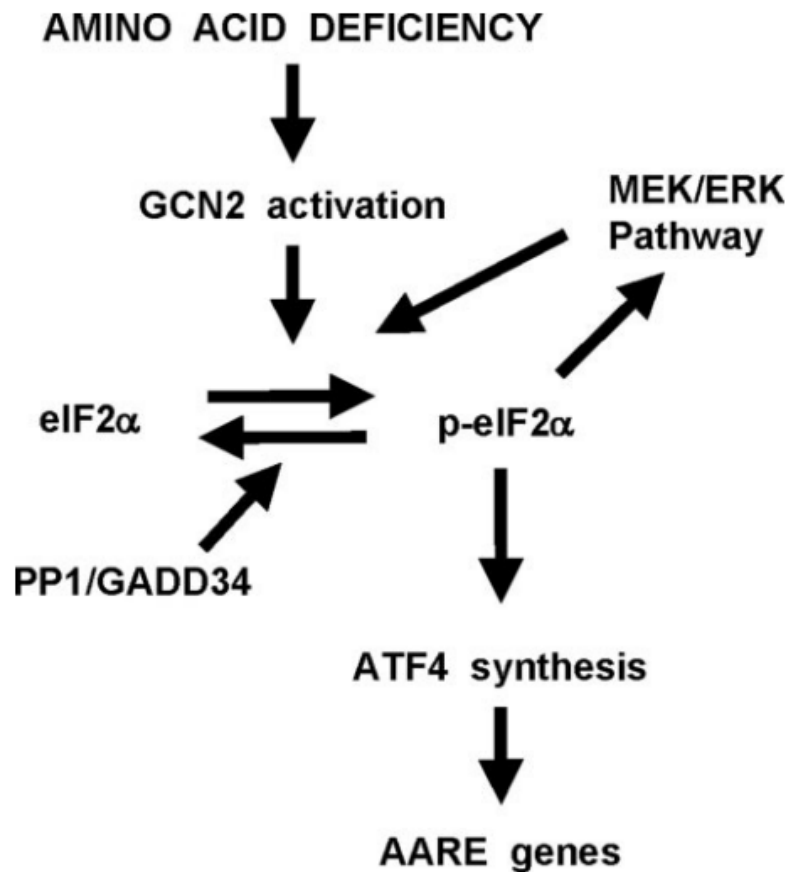
#### **4.1. Implication de la voie ERK1/2**

Des études ont déjà montré l'implication des MAPKs dans la réponse à la carence en acides aminés. La plupart de ces travaux concerne le rôle des kinases ERK1/2.

Ainsi, l'équipe de G.C. Gazzola a démontré que l'incubation de fibroblastes humains dans un milieu totalement privé d'acides aminés induisait la phosphorylation de ERK1/2 dès 5 minutes. Cette activation se traduit par une hausse de 4 fois de son activité kinase. Egalement, leurs résultats montrent que cette même carence induit une hausse de l'activité de transport du système A. Or l'inhibiteur de ERK1/2 (PD98059) inhibe l'induction de l'activité de ce transport. Ces travaux sont les premiers éléments montrant un rôle de ERK dans l'adaptation cellulaire à un milieu carencé en acides aminés (Franchi-Gazzola et al, 1999).

D'autre part, les travaux de Thiaville *et al.* (Thiaville et al, 2008a) ont montré que l'inhibition de MEK1/2 par le PD98059 ou le U0126 entraînait une inhibition de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  suite à une carence en histidine, dans les cellules HepG2 (Figure 61). En revanche, les inhibiteurs de JNK (SP600125) et de p38 (SB203580) n'affectent pas la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ . Par conséquent, l'inhibition de MEK1/2 entraîne un blocage de l'induction du gène ATF4-dépendant : SNAT2, suite à cette même carence. Ce résultat corrèle parfaitement l'observation de la phosphorylation de ERK1/2 induite dès 2 heures de carence en histidine et qui persiste après 8 heures. Egalement, l'auteur rapporte que ce mécanisme est dépendant de la présence de mGCN2 et d'eIF2 $\alpha$ . En effet, il démontre que les cellules mutantes sur la sérine 51 d'eIF2 $\alpha$  (forme non phosphorylable) ainsi que les cellules mGCN2-/- présentent une hyperphosphorylation de ERK au niveau basal. La forme phosphorylée de ERK tend à diminuer lorsque les cellules sont carencées en histidine (Thiaville et al, 2008b). Cette même équipe a montré que le traitement au PD98059 inhibait la phosphorylation d'un autre facteur liant l'AARE : C/EBP $\beta$ , en réponse à une carence en leucine. Ceci suggère que la voie ERK régule également l'activité de ce facteur. Toutefois cette phosphorylation intervient dans la phase tardive de carence en acides aminés (après 8 heures de carence) et le rôle de celle-ci reste à déterminer (Thiaville et al, 2008a).

Enfin, récemment l'équipe de Z. Wang a rapporté qu'une carence totale en acides aminés de cellules SW480 induisait l'expression des gènes modèles : ATF3 et p21. En revanche, cette même carence provoque en parallèle une baisse de 5 fois du taux de transcrits de Wnt5a. Cette répression de Wnt5a conduit à une moindre concentration de  $\beta$ -caténine nucléaire après 12 heures de carence, signifiant une activation moindre de la voie  $\beta$ -caténine/Wnt. De plus, les auteurs décrivent que, dans ce même laps de temps, la phosphorylation de ERK1/2 est



**Figure 61: Modèle de régulation de la voie mGCN2 par la signalisation MEK/ERK en réponse à une carence en acides aminés indispensables.** En réponse à une carence en acides aminés, la voie de signalisation MEK/ERK est activée. Ceci permettra la phosphorylation de eIF2 $\alpha$  par mGCN2 (extrait de Thiaville M.M. *et al.*, 2008).

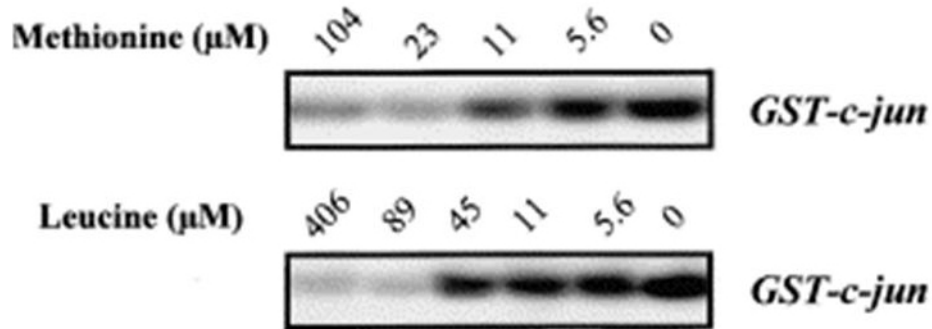
augmentée. L'ajout de l'inhibiteur de MEK1/2 (U0126) provoque la restauration du taux de transcrits de Wnt5a dans les cellules carencées. Ces travaux illustrent bien que les acides aminés contrôlent la voie MEK/ERK et indirectement la voie Wnt/ $\beta$ -caténine (Wang & Chen, 2009).

#### **4.2. Implication de la voie JNK**

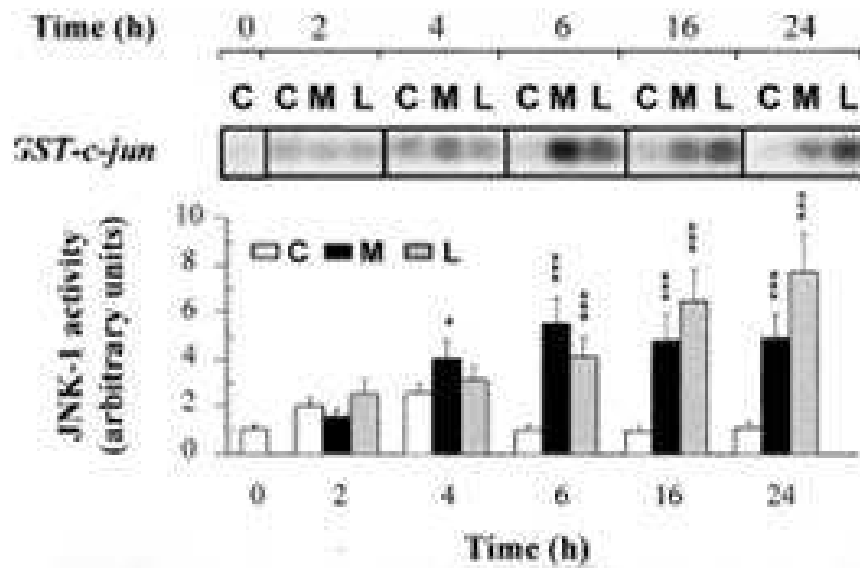
En plus des éléments apportés sur l'activation de ERK, l'équipe de G.C. Gazzola a montré une légère induction de la phosphorylation du résidu tyrosine et de l'activité kinase de JNK1 après 5 minutes d'incubation dans le milieu totalement carencé. Toutefois, cette activité revient au niveau du contrôle à t=60 minutes. Un second article de Aubel *et al.* (Aubel et al, 2001) rapporte qu'une carence en leucine ou méthionine de cellules HeLa conduit à l'activation de la SAPK : JNK1. Cette activation a été étudiée par la mesure de l'activité kinase sur une construction GST-c-jun. Elle augmente dès 6 heures de privation et persiste après 24 heures. Cette induction est réversible par rajout d'acides aminés dans le milieu de culture. Toutefois, dans cette publication, aucune donnée ne relie la hausse de l'activité JNK1 à la phosphorylation d'ATF2. D'autre part, l'activation de JNK1 est tardive et ne coïncide donc pas avec la cinétique de phosphorylation d'ATF2, induite dès 30 minutes de carence en acides aminés. Enfin, l'ajout de l'antioxydant N-acétylcystéine dans le milieu carencé en leucine ou méthionine provoque une réduction de l'activité kinase de JNK1 respectivement de 59% ou 36%. Ce résultat suggère que JNK1, lors d'une carence en acides aminés indispensables, est activée en partie par une élévation de l'état d'oxydation de la cellule (Figure 62) (Aubel et al, 2001). Enfin, en 2003, l'équipe de M. Pastor-Anglada s'est intéressée à la modulation de l'activité du transporteur des acides aminés neutres (Système A) et de la régulation transcriptionnelle de l'un de ces composants SNAT2, par la carence en acides aminés (Lopez-Fontanals et al, 2003). Leurs travaux ont montré que les kinases ERK1/2 et JNK1/3 étaient phosphorylées dans le cadre d'une carence totale en acides aminés des cellules CHO-K1. Toutefois, les fenêtres d'activation de ces kinases sont différentes. En effet, ERK1/2 sont induites entre 10 et 15 minutes de carence alors que JNK1/3 sont phosphorylées dès 10 minutes de limitation en acides aminés et ceci persiste au delà de 30 minutes. Aucune activation de p38 n'a été observée dans ce contexte. Les auteurs ont également montré que la transfection d'un dominant négatif de JNK1 ou le traitement des cellules avec les inhibiteurs de ERK1/2 (PD98059) ou de p38 (SB202190) inhibent l'induction du messager de SNAT2 associée à la diminution de l'activité du Système A par une carence de 12 heures en acides aminés. Egalement la transfection d'un dominant négatif



A)



B)



**Figure 62: Activation de JNK1 par une carence en acides aminés indispensables.** A) Une carence de 20 heures en méthionine (11 $\mu\text{M}$ ) ou en leucine (45 $\mu\text{M}$ ) augmente l'activité de JNK1. B) Analyse cinétique de l'activité kinase JNK1 en réponse à une carence totale en méthionine (M) ou en leucine (L) (extrait de Aubel C. *et al.*, 2001).

de la MAP2K : MKK4 inhibe l'activité de ce transporteur, après 12 heures de carence totale en acides aminés. Les conclusions de cet article sont que la carence en acides aminés active les MAPKs : JNK1 et ERK1/2, qui permettent l'adaptation cellulaire à ce stimulus notamment en régulant l'expression du gène SNAT2. L'induction de ERK1/2 est, selon les auteurs, uniquement associée à une contraction du volume cellulaire en réponse à ce stimulus. Concernant les résultats ambigus sur le rôle de p38 (pas de phosphorylation de p38 observée, mais inhibition du système A par le SB202190 au cours de la carence en acides aminés), les auteurs concluent que cette kinase n'est pas essentielle pour l'adaptation cellulaire à une limitation totale en acides aminés. Seule l'activation de la voie MKK4>JNK1 est spécifique de la réponse à la carence, et influe favorablement sur la transcription de SNAT2 et l'activité du système A au cours d'une carence en acides aminés.

### **4.3 Conclusions**

Peu de données sont disponibles sur les rôles des MAPKs dans la réponse à une carence en acides aminés. Toutefois, les deux voies de signalisation ERK1/2 et JNK ont été les plus étudiées. Dans cette conclusion, les différents résultats publiés dans la littérature seront résumés et les points de discordances entre ces différentes publications seront relevés.

*ERK1/2* : Concernant cette voie, celle-ci régulerait la voie mGCN2/ATF4, notamment en contrôlant la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  (travaux de Thiaville *et al.*). Pourtant, les résultats présentés dans les différentes publications sont discordants au niveau de la fenêtre d'activation de cette kinase. Les travaux de l'équipe de G.C. Gazzola et celle de M. Pastor-Alaga montrent une activation de cette kinase dès 5-10 minutes de carence. Toutefois, la première équipe indique que cette activation perdure au-delà de 3 heures de privation alors les résultats du second laboratoire précisent qu'elle prend fin après 15 minutes. Enfin les travaux de Thiaville *et al.* montrent une activation de cette kinase après 8 heures de carence. Le mécanisme d'activation et la voie de signalisation aboutissant à l'activation de ERK dans ce contexte restent à déterminer. Pour l'instant, l'hypothèse retenue par deux de ces équipes est que la modification du volume cellulaire induit par une carence en acides aminés est responsable de l'induction de cette kinase.

*JNK1* : Concernant l'étude de cette voie, les résultats présentés sont discordants. L'équipe de G.C. Gazzola indique que JNK1 est activée dès 5 minutes de carence en acides aminés et que ceci ne persiste pas après 1 heure de privation. Les résultats de Aubel *et al.* présentent une hausse de l'activité de cette kinase seulement après 6 heures de carence. Cet article suggère

que cette activation, du moins partiellement, est provoquée par l'augmentation de l'état oxydé de la cellule induite par la carence en acides aminés.

Pour conclure sur l'induction des MAPKs dans un contexte de carence en acide aminés, il est clair que les kinases ERK1/2 et JNK sont activées. En revanche, les résultats présentés montrent bien de grandes divergences au niveau des fenêtres d'activation de ces kinases. Egalement, il n'est pas encore admis que la carence en acides aminés soit l'inducteur direct de ces kinases, mais plutôt un effet secondaire de celle-ci (hausse du stress oxydant, variation du volume cellulaire). Ceci suggère donc que les mécanismes moléculaires activant ERK et JNK sont différents et mettent en jeu de nouvelles voies de signalisation encore non déterminées. Enfin, aucune donnée ne permet de rapporter l'activation de ces deux voies à l'induction de la phosphorylation du facteur ATF2 en réponse à la carence en acides aminés.

# RESULTATS

# **RESULTATS**

## **1. Objectif de la thèse**

Mon projet de thèse vise à mieux comprendre les mécanismes par lesquels les acides aminés peuvent réguler l'expression des gènes chez les mammifères. Plus particulièrement, mes travaux se sont focalisés sur l'identification d'une nouvelle voie de signalisation activée par le déficit en un acide aminé indispensable et pouvant moduler l'expression de gènes cibles spécifiques.

Mon travail a permis de déterminer que cette nouvelle voie de signalisation conduit à la phosphorylation du facteur de transcription ATF2 sur les thréonines 69 et 71. Cette phosphorylation nécessite la mise en jeu du module MAPK : MEKK1>MKK7>JNK2. Celui-ci est régulé par deux GTPases : Rac1 et Cdc42. De plus, nous avons pu mettre en évidence que cette voie de signalisation nécessitait la mise en jeu d'une protéine G au niveau membranaire Gα12. L'impact de cette nouvelle voie de signalisation sur la transcription AARE-dépendante du gène *ATF3* a été également démontré.

## 2. Publication:

# Identification of a novel amino acid response pathway triggering ATF2 phosphorylation in mammals

### 1. Introduction

Le projet dans lequel s'inscrit mon travail de thèse vise à mieux comprendre les mécanismes par lesquels les acides aminés modulent la transcription des gènes chez les eucaryotes. Comme décrit dans la partie bibliographie, un certain nombre de voies de signalisation peuvent être modulées par les variations de concentrations en acides aminés. Ces voies peuvent être classées en deux sous groupes 1) celles activées par la supplémentation en acides aminés comme mTORC1 ou 2) celles activées par la carence en acides aminés. Dans ce deuxième sous-groupe, une voie relativement bien décrite met en jeu la kinase mGCN2 et le facteur de transcription ATF4. Elle est essentielle pour l'induction de la majorité des gènes cibles par la carence en acides aminés. En revanche, la seconde voie aboutissant à la phosphorylation du facteur ATF2 sur la thréonine 71 reste inconnue.

Brièvement, ATF2 a été décrit comme étant un facteur de transcription constitutivement fixé à l'AARE de gènes cibles comme *CHOP* ou *ATF3*. Sa régulation, essentiellement post-transcriptionnelle, est réalisée par phosphorylation de la thréonine 71 en réponse à une carence en leucine. L'utilisation de cellules invalidées pour l'expression d'ATF2 ont permis de montrer que ce facteur est essentiel pour l'induction de l'expression des gènes *ATF3* et *CHOP* par ce même stimulus. Enfin, ATF2 est essentiel pour le recrutement d'une activité Histone Acétyl Transférase et l'acétylation des histones H4 et H2B au niveau de l'AARE de ces deux gènes, en réponse à la privation en leucine.

Pour ces raisons, le projet de recherche qui m'a été confié vise à identifier la kinase activée par une carence en acides aminés indispensables et responsable de la phosphorylation de ce facteur ATF2. Ce projet a également pour but de déterminer une seconde voie de signalisation (en plus de ce la voie mGCN2/ATF4) mise en jeu au cours d'une carence en leucine et de mesurer son impact sur la transcription de gènes cibles comme *ATF3*.

## **2. Modèles utilisés**

### **2.1. Les cellules en culture**

Afin de réaliser nos expériences, nous avons utilisé plusieurs modèles de cellules en culture. Tout d'abord, les cellules HeLa et HEK293 sont des lignées humaines immortalisées. Les cellules HeLa sont issues d'un adénome de l'utérus alors que les HEK293 proviennent de cellules embryonnaires de rein. Ces deux types cellulaires possèdent l'avantage d'être immortalisés, et sont facilement manipulables par des outils de biologie moléculaire (transfection de siRNA ou de plasmides). Nous avons également utilisé des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) obtenus à partir de souris invalidées pour certains gènes spécifiques (mGCN2, ATF2). Ces lignées cellulaires restent un modèle de choix pour caractériser le rôle de ces protéines dans notre modèle d'étude.

### **2.2. La carence en leucine**

Lors des expériences de carences en acides aminés, nous avons choisi, dans la majorité des cas, de supprimer la leucine, et ce pour plusieurs raisons. Tout d'abord, condition primordiale, la leucine est un acide aminé indispensable chez les mammifères. De plus, son transport à travers la membrane plasmique est rapide grâce à un système de diffusion facilitée (système L), permettant d'obtenir un équilibre de concentration rapide entre les milieux intra et extra-cellulaires. Enfin, la leucine n'est ni un acide aminé glucoformateur, ni cétoène. Elle n'est donc pas métabolisée par les cellules utilisées dans nos expériences. Ainsi, même une longue période d'étude (par exemple 16 heures) n'entraîne pas de diminution significative de la concentration en leucine dans le milieu de culture contrôle. De ce fait, les effets observés ne pourront pas être attribués à la modification d'une voie métabolique dans laquelle la leucine serait impliquée.

### **2.3. Le gène *ATF3***

*ATF3* fait parti des premiers gènes à avoir été identifiés comme répondant à une carence en leucine. Il appartient à la classe de gènes répondant précocement et fortement à cette privation. Ceci s'explique par le fait que le niveau d'expression du gène *ATF3*, en dehors de toute stimulation, est extrêmement faible. Cette caractéristique permet donc d'observer un taux d'induction élevé lors d'une carence en leucine. De plus, l'expression de ce gène est ubiquiste, ce qui permet de travailler dans différents types cellulaires (HeLa, fibroblastes,...).

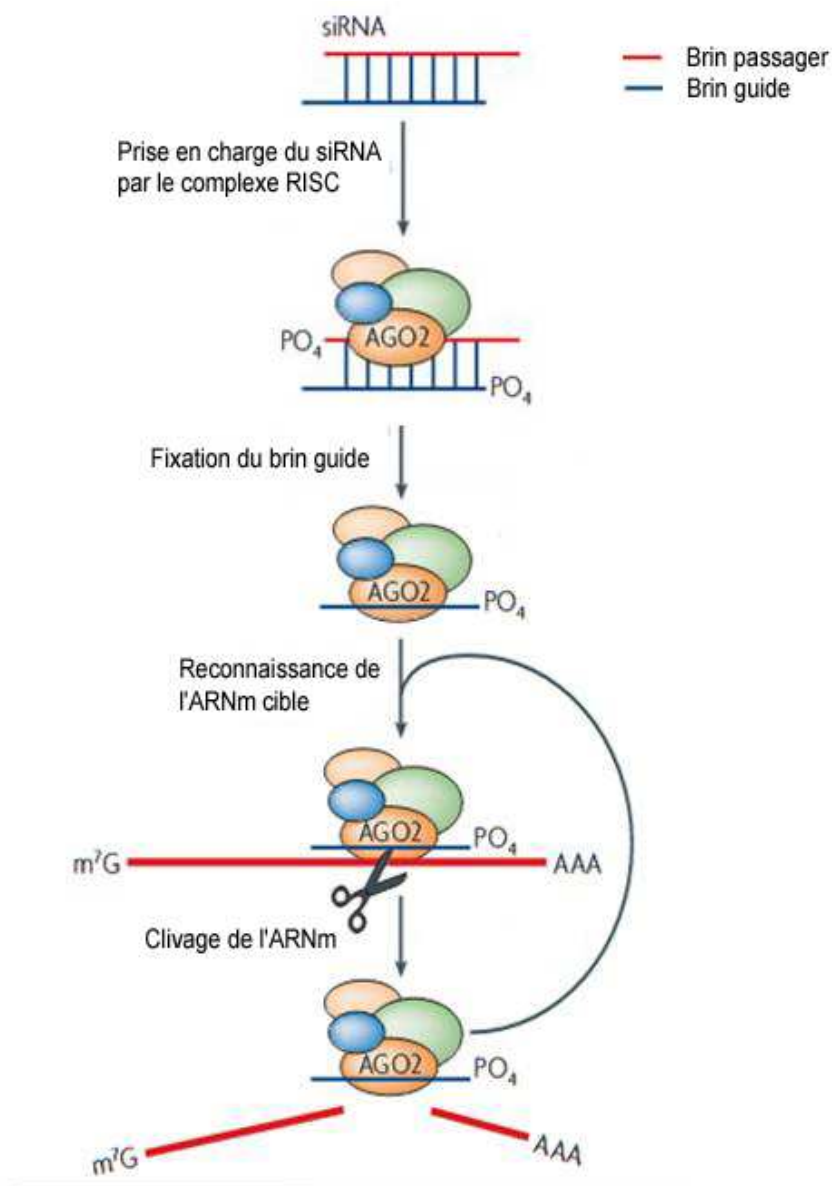
Egalement, le promoteur d'*ATF3* a été relativement bien décrit, notamment concernant l'élément de réponse aux acides aminés (AARE). Ceci a permis d'obtenir rapidement tous les outils nécessaires à son étude, en particulier au niveau moléculaire. Enfin, un certain nombre de travaux insistent sur l'aspect ATF2-dépendant de ce gène, ce qui en fait un modèle de choix pour l'étude de la voie de signalisation conduisant à la phosphorylation d'ATF2

### **3. Principale technique utilisée : les ARN interférences**

Pour déterminer les intermédiaires de la voie de signalisation aboutissant à la phosphorylation d'ATF2, nous avons abondamment utilisé la technique de l'ARN interférence (ou siRNA pour small interfering RNA). La génération d'ARN interférence est un phénomène naturel retrouvé chez tous les organismes eucaryotes. De part leur immense potentiel en tant qu'outils moléculaires, ils ont fait l'objet d'études intensives depuis le début des années 2000. Les siRNA sont des séquences ARN de 21 nucléotides, sous forme de double brin. La transfection de ces séquences induit leurs reconnaissances par le complexe RISC (RNA Induce Silencing Complex) provoquant l'activation de celui-ci (Figure 63). L'un des brins du siRNA (dit « passager ») est éliminé alors que l'autre (dit « guide ») sert à cibler l'ARN messager à dégrader. La reconnaissance de ce messenger se fait par complémentarité des bases nucléiques. Une fois cette reconnaissance effectuée, la protéine endonucléase Ago2 (faisant partie du complexe RISC) clive le messenger de part et d'autre de la zone d'hybridation. Ceci entraîne la dégradation du messenger mais génère également de nouvelles séquences double brin strictement identiques au siRNA exogène (pour revue : (Rana, 2007)).

La technique de transfection de siRNA présente plusieurs avantages : i) le messenger à cibler est reconnu avec une haute spécificité, de par l'obligation d'une stricte homologie de séquence entre le brin guide et l'ARNm. Ceci permet notamment de pouvoir discriminer un ARNm au sein de plusieurs isoformes. ii) Ce type d'expérience est relativement simple à mettre en place et ne nécessite qu'une transfection transitoire. iii) Les siRNA se transmettent dans les cellules filles. De plus, le clivage d'ARNm par le complexe RISC génère la synthèse de nouveaux ARN double brins. Ceci amplifie donc le mécanisme mis en jeu après la transfection. iv) L'invalidation d'une fonction par siRNA est transitoire. La probabilité que les cellules traitées puissent dériver voire mettre en place des mécanismes compensatoires est faible. En revanche, les inconvénients sont : i) l'invalidation par siRNA ne constitue pas un knock-out d'un gène. De ce fait, le messenger ciblé peut ne pas être totalement dégradé et une partie peut donc être traduite en protéine. ii) Le knock-down d'un ARNm par siRNA peut ne





**Figure 63: Principe général de la technique de l'ARN interférence.** Après transfection, les siRNA sont pris en charge par le complexe RISC. Le choix du brin guide va activer ce complexe qui va alors cibler les ARNm à dégrader. Le clivage de ce messenger sera assuré par l'endonuclease Ago2. Par la suite, le complexe RISC peut être recyclé et reprendre plusieurs événements de clivage (d'après Rana T.M., 2007).

pas forcément se traduire par une baisse importante de la protéine correspondante, notamment si celle-ci possède une demi-vie élevée.

## **4. Publication**

**Chaveroux C**, Jousse C, Cherasse Y, Maurin AC, Parry L, Carraro V, Derijard B, Bruhat A, Fafournoux P. Identification of a novel amino acid response pathway triggering ATF2 phosphorylation in mammals. *Mol. Cell. Biol.* 2009 Oct 12. [Epub ahead of print]

+ Supplementary data S1

## Identification of a Novel Amino Acid Response Pathway Triggering ATF2 Phosphorylation in Mammals<sup>∇†</sup>

Cédric Chaveroux,<sup>1</sup> Céline Jousse,<sup>1</sup> Yoan Cherasse,<sup>1</sup> Anne-Catherine Maurin,<sup>1</sup> Laurent Parry,<sup>1</sup> Valérie Carraro,<sup>1</sup> Benoit Derijard,<sup>2</sup> Alain Bruhat,<sup>1</sup> and Pierre Fafournoux<sup>1\*</sup>

Unité de Nutrition Humaine, UMR 1019, INRA de Theix, 63122 Saint Genès Champanelle, France,<sup>1</sup> and Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Moléculaire, CNRS UMR 6548, Faculté des Sciences, Université de Nice Sophia Antipolis, 28 Avenue Valrose, 06108 Nice Cedex 2, France<sup>2</sup>

Received 15 April 2009/Returned for modification 8 June 2009/Accepted 30 September 2009

**It has been well established that amino acid availability can control gene expression. Previous studies have shown that amino acid depletion induces transcription of the *ATF3* (activation transcription factor 3) gene through an amino acid response element (AARE) located in its promoter. This event requires phosphorylation of activating transcription factor 2 (ATF2), a constitutive AARE-bound factor. To identify the signaling cascade leading to phosphorylation of ATF2 in response to amino acid starvation, we used an individual gene knockdown approach by small interfering RNA transfection. We identified the mitogen-activated protein kinase (MAPK) module MEKK1/MKK7/JNK2 as the pathway responsible for ATF2 phosphorylation on the threonine 69 (Thr69) and Thr71 residues. Then, we progressed backwards up the signal transduction pathway and showed that the GTPase Rac1/Cdc42 and the protein Gα12 control the MAPK module, ATF2 phosphorylation, and AARE-dependent transcription. Taken together, our data reveal a new signaling pathway activated by amino acid starvation leading to ATF2 phosphorylation and subsequently positively affecting the transcription of amino acid-regulated genes.**

In mammals, amino acids exhibit two important characteristics: first, nine amino acids are essential in healthy adult humans, and second, there is no proper storage of amino acids, which means that essential amino acids must be obtained from the diet. Consequently, amino acid homeostasis may be altered in response to malnutrition (4, 40, 59) and also by various forms of pathology leading to a negative nitrogen balance (chronic pathology, AIDS, and cancer, etc.) (41, 86, 89). Very often, in one of these situations, the availability of one or several essential amino acids is dramatically affected. Consequently, individuals have to adjust several physiological functions involved in the defense/adaptation response to amino acid limitation. In such a situation, it has been shown that amino acids by themselves are involved in a variety of regulatory processes (26, 47, 67). For all these reasons, the role of amino acids as signaling molecules that regulate gene expression and physiological functions has received considerable attention in recent years. However, the molecular mechanisms involved in this process are not completely understood for mammals at present (44, 47, 52).

Up to now, two ubiquitous amino acid-sensing processes have been described to occur in mammals. They involve protein kinases mTORC1, activated by amino acid supplementation, and GCN2, activated by amino acid starvation. These two kinases play a major role in the control of protein synthesis (71), transcription, and mRNA turnover of specific genes (24,

46, 69). Although the mechanisms involved in the regulation of gene expression by the mTORC1 pathway are not yet identified, the role of the GCN2 pathway has been widely studied using the experimental model of limitation with one essential amino acid. This model has been used to characterize the cellular transcriptional response to nutritional stress. At a molecular level, most of the results have been obtained by studying the transcriptional regulation of the activating transcription factor 3 (*ATF3*), C/EBP homologous protein (*CHOP*), and asparagine synthetase (*ASNS*) genes. An amino acid response element (AARE) was identified in the promoters of these genes and can confer amino acid responsiveness to a heterologous promoter (5, 13, 68). Subsequently, functional sequences that share a high level of similarity with the described AARE were identified in other amino acid-regulated genes, such as the system A amino acid transporter (*SNAT2*) (66) and arginine/lysine transporter cat-1 (*cat-1*) genes (55). The sequences of these AAREs are related to C/EBP and ATF/*cis*-acting replication element binding sites. Most of these AAREs were described as binding a combination of several transcription factors and regulatory proteins to precisely modulate the rate of transcription (ATF4, ATF2, C/EBPβ, ATF3, TRB3, PCAF, and JDP2) (for a review, see reference 47). Of these regulatory proteins, two transcription factors, ATF4 and ATF2, have been shown to play an essential role in the amino acid regulation of a large number of genes (2, 12).

Changes in ATF4 protein level are induced in response to amino acid starvation by a pathway that involves activation of the GCN2 kinase by the accumulation of free tRNA, which in turn catalyzes phosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2 (eIF-2α). An immediate consequence of eIF-2α phosphorylation is a general decrease in protein synthesis and enhanced translation of ATF4, due to the presence

\* Corresponding author. Mailing address: UMR 1019, Unité Nutrition Humaine, INRA de Theix, 63122 St. Genès Champanelle, France. Phone: (33) 4 73 62 45 62. Fax: (33) 4 73 62 47 55. E-mail: pierre.fafournoux@clermont.inra.fr.

† Supplemental material for this article may be found at <http://mcb.asm.org/>.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 12 October 2009.

of upstream open reading frames in the 5' untranslated region of its mRNA (56, 81). Subsequently, ATF4 induces the expression of a large number of specific target genes (2, 31, 75).

ATF2 is the other transcription factor essential for amino acid control of gene transcription. ATF2 functions either as a homodimer or as a heterodimer with other members of the ATF family, as well as other bZIP proteins, to bind to specific DNA sequences and activate gene expression (8, 82). One major role of ATF2 is to regulate the response of cells to stress signals (30, 34). The transactivation capacity of the N-terminal domain of this transcription factor can be enhanced through phosphorylation of two N-terminal threonine residues, Thr69 and Thr71 (human ATF2). Phosphorylation at these residues has been shown to be induced in response to several stress signals in a mitogen-activated protein kinase (MAPK)-dependent pathway (3, 53, 60, 65).

In the context of gene regulation by amino acid starvation, we previously studied the role of ATF2 by using leucine-regulated transcription of the *CHOP* and *ATF3* genes as a working model (2, 12). It was shown that (i) in cells devoid of ATF2, the induction of *CHOP* or *ATF3* transcription upon amino acid starvation is lost; (ii) ATF2 binds in vivo to the AARE under starved and unstarved conditions; (iii) ATF2 is phosphorylated on Thr71 in response to amino acid starvation; and then, (iv) ATF2 promotes modification of the chromatin structure to enhance transcription (12). Whereas the molecular events leading to ATF4 regulation have been well identified, the signaling pathway responsible for ATF2 phosphorylation in response to amino acid starvation is not known.

This study was designed to identify the signaling pathway leading to phosphorylation of ATF2 in response to amino acid starvation. Using individual gene knockdown experiments, we demonstrated that c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase 2 (JNK2) is essential for regulation of ATF2 phosphorylation. Then, we progressed backwards up the signal transduction pathway to identify the different steps required. Taken together, our data reveal a new signaling pathway activated by amino acid starvation and leading to ATF2 phosphorylation.

## MATERIALS AND METHODS

**Cell culture and treatment conditions.** HeLa cells, HEK293 cells, and mouse embryonic fibroblasts (MEF) were cultured at 37°C in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)–Ham's F-12 medium (Sigma) containing 10% fetal bovine serum. When indicated, DMEM–Ham's F-12 medium lacking leucine was used. In all experiments involving amino acid starvation, 10% dialyzed fetal calf serum (A15-107) (PAA laboratories) was used.

**Antibodies.** The following antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology: those against ATF2 (sc-187), ATF4 (sc-200), JNK1 (sc-571), MEKK1 (sc-252), Gα12 (sc-409), and Gα13 (sc-410). Antibodies against ATF2 phosphorylated on Thr71 (P-Thr71 ATF2) (1268-1), P-Tyr185 JNK (2155-1), JNK2 (2037-1), MKK4 (1650-1), MKK7 (1949-1), MEKK2 (1662-1), and MEKK3 (1672-1) were obtained from Epitomics. The anti-P-Thr69+Thr71 ATF2 (9225), anti-P-Thr389 S6K (9205), and anti-P-Ser408 MEF2A (9737) antibodies were from Cell Signaling Technology. The Rac1 (610650), P-Thr202+Tyr204 extracellular signal-regulated kinase (ERK) (612358), and Cdc42 (610928) antibodies were provided by BD Biosciences.

**Immunoblot analysis.** Cells were lysed in a buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 50 mM NaF, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 100 nM okadaic acid, 25 mM β-glycerophosphate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and a protease inhibitor cocktail from Sigma. Proteins (40 μg) were resolved by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto a Hybond-P polyvinylidene difluoride membrane (Amersham Biosciences). Membranes were incubated in blocking solution (5% nonfat milk powder in Tris-buffered saline, 0.1% Tween 20) for 1 h at room

temperature. The blots were then incubated with primary antibody in blocking solution overnight at 4°C. Antibodies were diluted in accordance with the manufacturer's instructions. The blots were washed three times in Tris-buffered saline, 0.1% Tween 20 and incubated with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin G (1:5,000) (Santa Cruz, CA) in blocking buffer for 1 h at room temperature. After three washes, the blots were developed using an enhanced chemiluminescence detection system (Amersham Biosciences).

**Oligonucleotides.** Oligonucleotides were from Sigma-Aldrich. When double-stranded oligonucleotides were required, equal numbers of moles of complementary strands were heated to 90°C for 1 min and annealed by slow cooling to room temperature.

**Plasmid construction and reagents.** TATA-*Tk*-Luc, containing the minimum herpes simplex virus promoter for thymidine kinase (positions –40 to +50), was generated as previously described (13). The 2xATF3AARE-*Tk*-Luc plasmid was constructed by inserting SacI-XhoI double-stranded oligonucleotides containing two copies of the ATF3 AARE sequence into the *Tk*-Luc plasmid. The 2xCHOPAARE-*Tk*-Luc plasmid was constructed as described in reference 13. The MAPK inhibitors SB20350 (tlrl-sb20) and U0126 (tlrl-u0126) were obtained from InvivoGen. The JNK inhibitor 8: J18 (420135) and rapamycin (553211) were from Calbiochem. The JNK inhibitor SP600125 (S5567-10MG) was from Sigma-Aldrich.

**siRNA transfection.** Small interfering RNA (siRNA) corresponding to MKK4 (SI02655079), MKK7 (SI02660588), MEKK1 (SI02659965), MEKK2 (SI02224166), MEKK3 (SI00605619), Rac1 (SI02655051), Cdc42 (SI02757328), Gα12 (SI00096565) and Gα13 (SI00089761) mRNA and to a control (1027280) were from Qiagen. siRNA against JNK1 (12936-42) and JNK2 (12936-44) were purchased from Invitrogen. The JNK1/2 siRNA primers (5'-AAAGAAUGUCCUACCUUCUdTd T-3' and 5'-AGAAGGUAGGACAUUCUUCUdTdT-3') target a common sequence in both JNK1 and JNK2 mRNA and was synthesized by Qiagen. One day before transfection with siRNA, HeLa cells were plated in six-well plates at 25% confluence. Then, 60 pmol of siRNA was transfected into the cells by using the calcium phosphate precipitation method as previously described (45). Seventy-two hours after transfection, the amino acid starvation experiment was performed and the expression level of target mRNA was analyzed by Western blotting.

**Transient transfection and Luc assay.** Cells were plated in 12-well dishes and transfected by the calcium phosphate coprecipitation method. Twenty-four hours after siRNA transfection (30 pmol), 1 microgram of luciferase (Luc) plasmid (2xATF3AARE-*Tk*-Luc or 2xCHOPAARE-*Tk*-Luc) was transfected into the cells, along with 0.1 μg of pCMV-βGal as an internal control. This plasmid carries the bacterial β-galactosidase gene fused to the human cytomegalovirus immediate-early enhancer/promoter region. Relative Luc activity was given as the ratio of relative Luc units/relative β-galactosidase units. All values are the means calculated from the results of at least three independent experiments performed in triplicate.

**Analysis of gene expression by use of real-time reverse transcription-PCR (RT-PCR).** Total RNA was prepared using an RNeasy minikit (Qiagen) and treated with DNase I, amplification grade (Invitrogen), prior to cDNA synthesis. RNA integrity was electrophoretically verified by ethidium bromide staining. RNA (0.5 mg) was reverse transcribed with 100 U of Superscript II plus RNase H-reverse transcriptase (Invitrogen), using 100 μM random hexamer primers (Amersham Biosciences), in accordance with the manufacturer's instructions. We used the following primers: those targeting mouse ATF3 (forward, 5'-CGC CATCCAGAATAAACACC-3'; reverse, 5'-GCAGGCACTCTGTCTTCTCC-3'), human ATF3 (forward, 5'-GCCATTGGAGAGCTGTCTTC-3'; reverse, 5'-GGGCCATCTGGAACATAAGA-3'), human ASNS (forward, 5'-ATCACTG TCGGGATGTACCC-3'; reverse, 5'-CTTCAACAGAGTGGCAGCAA-3'), human β-actin (forward, 5'-TCCCTGGAGAAGAGCTACGA-3'; reverse, 5'-AGCACTGTGTGGCGTACAG-3'), and mouse β-actin (forward, 5'-TACAGC TTCACCACCACAGC-3'; reverse, 5'-AAGGAAGGCTGGAAAAGAGC-3'). Real-time quantitative PCR was carried out using a LightCycler system (Roche Applied Science) as described previously (2). Relative results were displayed as relative levels of ATF3 per β-actin. Each experiment was repeated at least four times.

**ChIP analysis.** Chromatin immunoprecipitation (ChIP) analysis was performed as previously described (12). The following antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA): those against ATF2 (sc-187) and ATF4 (sc-200). Anti-P-thr71 ATF2 (9221) was obtained from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). The primers used to amplify the mouse ATF3 AARE sequence were 5'-GGTCTCCACCACCTTTTG-3' and 5'-CTC GCTGAGTGAGACTGTGG-3'. The results are expressed as the percentage of antibody binding versus the amount of PCR product obtained using a standardized aliquot of input chromatin. Sample results are the means from at least three independent immunoprecipitations.



## RESULTS

**ATF2 is phosphorylated in response to amino acid starvation.** We first determined the role of ATF2 and ATF4 in the amino acid regulation of *ATF3*. This gene was chosen as a working model since previous studies have shown that (i) *ATF3* is dramatically induced upon amino acid starvation and that (ii) it contains a genomic *cis*-acting AARE (*ATF3* AARE) that has been shown to be involved in the binding of several transcription factors (12, 68). To determine whether ATF2 or ATF4 is required to mediate *ATF3* mRNA induction during a short period of leucine starvation, we used MEF deficient in ATF2 or ATF4. Figure 1A shows that *ATF3* expression is dramatically enhanced in response to a 4-hour period of leucine starvation. In contrast, lack of either ATF4 or ATF2 resulted in a loss of *ATF3* mRNA inducibility.

To investigate the binding of these factors on the *ATF3* AARE, cells were incubated in control or leucine-free medium for 4 h and ChIP assays were performed with primer sets covering the *ATF3* AARE (Fig. 1B). For wild-type cells, ChIP experiments showed an increase in ATF4 binding to the AARE following leucine deprivation whereas binding of ATF2 remained constitutive. ChIP analysis using an antibody that specifically recognizes ATF2 phosphorylated on threonine 71 revealed that binding of the phosphorylated form of ATF2 was significantly increased after removal of leucine. In ATF2-deficient cells, neither ATF2 nor phosphorylated ATF2 bound to the *ATF3* AARE was detected. However, the increase in ATF4 binding remained. In cells lacking ATF4, the levels of bound ATF2 and the increase of bound phospho-ATF2 were similar to those in the wild-type cells. Taken together, these results demonstrate that ATF4 binding and ATF2 phosphorylation are two independent events that are associated with *ATF3* induction upon amino acid starvation.

In the next experiment, we investigated the kinetics of ATF2 phosphorylation on Thr71 and on a combination of Thr69 and Thr71 (Thr69+Thr71) in response to leucine starvation. The phosphorylated form of ATF2 was estimated using two specific antibodies recognizing either phosphothreonine 71 or double phosphorylation on Thr69 and Thr71. Figure 1C shows that leucine deprivation resulted in a rapid and sustained phosphorylation of ATF2 on both Thr69 and Thr71 that appeared at least 30 min after the beginning of leucine starvation and persisted for up to 4 h. Furthermore, we checked the effects on ATF2 phosphorylation of starvation for other individual amino acids. Figure 1D shows that starvation for essential amino acids such as lysine and methionine enhanced ATF2 phosphorylation but that glutamine starvation (glutamine being a nonessential amino acid) had no significant effects. This experiment also showed that ATF4 expression is induced by lysine or methionine starvation, confirming that the GCN2/ATF4 pathway is activated following essential-amino-acid starvation.

**GCN2 and mTORC1 pathways are not required for ATF2 phosphorylation in response to amino acid starvation.** The simplest hypothesis for explaining phosphorylation of ATF2 by amino acid starvation would be the involvement of one of the two ubiquitous pathways previously described. The first one involves the protein kinase GCN2, activated by the accumulation of free tRNA resulting from the lack of amino acid. We checked whether uncharged tRNA<sup>leu</sup> accumulation resulting

from leucine starvation is involved in phosphorylation of ATF2 on Thr69+Thr71. We treated the cells for 2, 4, and 8 h with 10 mM of leucinol, an alcohol derivative of leucine. Leucinol inhibits leucyl-tRNA-synthetase and then increases the uncharged tRNA<sup>leu</sup> content of the cells. Figure 2A shows that leucinol treatment did not affect the phosphorylation of ATF2 but induced ATF4 expression. This result demonstrates that accumulation of uncharged tRNA<sup>leu</sup> alone is not able to induce ATF2 phosphorylation. We also measured the phosphorylation of ATF2 in response to leucine starvation in GCN2<sup>-/-</sup> and GCN2<sup>+/+</sup> MEF cells (Fig. 2B). Measurement of eIF-2 $\alpha$  phosphorylation and ATF4 expression indicates that the GCN2 pathway is not activated in <sup>-/-</sup> cells. Our results clearly show that ATF2 is phosphorylated upon leucine starvation in both GCN2<sup>+/+</sup> and GCN2<sup>-/-</sup> cells, demonstrating that the GCN2 kinase is not involved in this process.

We next addressed the contribution of mTORC1 inhibition in phosphorylation of ATF2. We treated the cells with rapamycin, a pharmacological inhibitor of mTORC1. Both amino acid starvation and rapamycin treatment are known to inhibit mTORC1 activity. Figure 2C shows that rapamycin treatment did not affect the phosphorylation level of ATF2. The efficiency of rapamycin treatment was checked by measuring the dephosphorylation of S6K1, a direct target of mTORC1. However, it has been shown that rapamycin does not inhibit all the function of mTORC1 (83); therefore, we cannot totally exclude the role of mTORC1 in this process. Taken together, our data show that ATF2 phosphorylation in response to amino acid starvation does not involve the GCN2 pathway and the rapamycin-sensitive component of mTORC1 activity.

**JNK2 inhibition abolishes amino acid starvation-induced ATF2 phosphorylation.** Numerous studies have shown that, in response to various stress signals, ATF2 is phosphorylated on Thr69 and Thr71 by the JNK and p38 pathways (11, 30, 80). In response to mitogens, such as insulin, ATF2 is phosphorylated via a two-step mechanism that involves the cooperation of two different kinases (ERK1/2 and p38 or JNK), which phosphorylate ATF2-Thr71 and then ATF2-Thr69, sequentially (3, 65). These data prompted us to analyze the role of the MAPK pathways in amino acid regulation of ATF2 phosphorylation. For that purpose, we used pharmacological inhibitors of these kinases. Figure 3 shows that inhibition of p38 by use of SB203580 (19) and prevention of ERK1/2 phosphorylation by MEK1/2 (MAPK/ERK kinase) inhibitor U0126 (19) had no effect on the induction of ATF2 phosphorylation on Thr69 and Thr71 by 4 h of leucine starvation. The efficiency of these inhibitors was checked by measuring ERK (78) and MEF2A (64, 88) phosphorylation (see Fig. S1 in the supplemental material). In contrast, inhibition of JNK by either JI8 (63, 77) or SP600125 (6) completely cancelled induction of ATF2 phosphorylation in response to leucine starvation. These results suggest that JNK rather than p38 or ERK is responsible for amino acid regulation of ATF2 phosphorylation. It is notable that ATF2 phosphorylations on Thr71 and on Thr69+Thr71 are similarly regulated by leucine starvation in the presence and absence of inhibitor, suggesting that these two residues are phosphorylated by a single protein kinase. Similar conclusions had previously been drawn for ATF2 phosphorylation in response to other stress inducers, such as UV, methyl methane sulfonate, or tumor necrosis factor  $\alpha$  (65). For these rea-

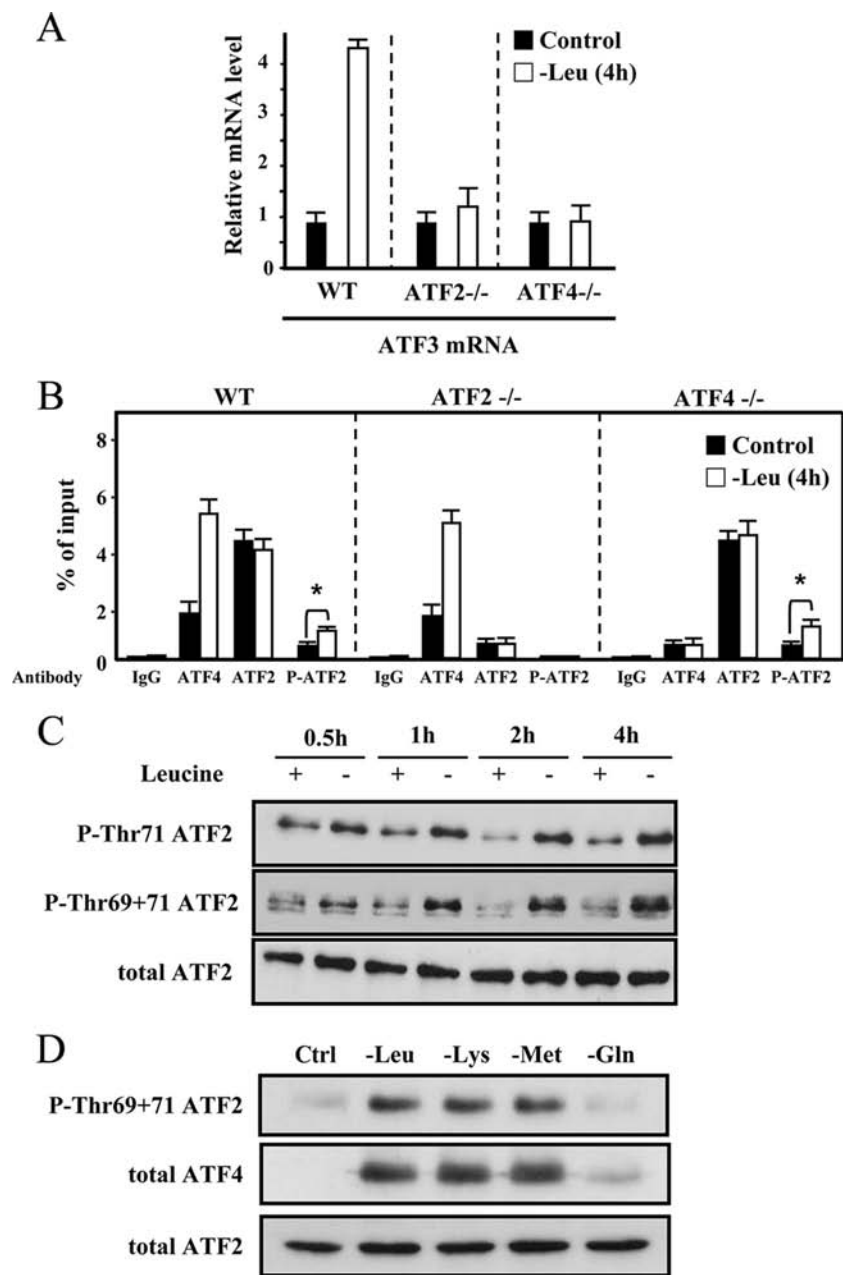


FIG. 1. Role of ATF2 in the transcriptional regulation of ATF3 in response to amino acid starvation. (A) ATF2<sup>-/-</sup>, ATF4<sup>-/-</sup>, and wild-type (WT) MEF were incubated for 4 h in either control or leucine-free (-Leu) medium and then harvested. Total RNA was extracted and analyzed by quantitative RT-PCR for ATF3 mRNA content as described in Materials and Methods. Each point represents the mean value of results from three independent experiments. We obtained the same results using the wild-type counterparts of the ATF2<sup>-/-</sup> and the ATF4<sup>-/-</sup> MEF (not shown). (B) ChIP analysis was performed using antibodies specific for ATF4, ATF2, and phosphorylated ATF2 (Thr71). Quantitative RT-PCR was performed with immunoprecipitated DNA and a dilution of input DNA samples, using primers to amplify the AARE region of the ATF3 promoter. Data were plotted as percentages of PCR product from immunoprecipitated DNA versus input DNA. Each point represents the mean value of results from three independent experiments, and the error bars represent the standard errors of the means (\* indicates statistical significance at *P* values of <0.05). IgG, immunoglobulin G. (C) Cells were incubated in either control or leucine-free medium and harvested after the indicated incubation times. Western blot analysis of phospho-ATF2 (Thr71 and Thr69+Thr71) and total ATF2 was performed with nuclear extract as described in Materials and Methods. (D) Cells were incubated for 4 h either in control medium (Ctrl) or in a medium devoid of one individual amino acid (leucine, lysine, methionine, or glutamine), and then analysis of phospho-ATF2 (Thr69+Thr71), ATF2, and ATF4 was performed.

sons, only the phosphorylation on ATF2-Thr71 will be shown in subsequent studies.

It has been well demonstrated that JNK proteins are regulated by dual phosphorylation of threonine and tyrosine in a TXY motif (21). To determine whether amino acid

starvation induces JNK phosphorylation, we measured the phosphorylated form of JNK on Tyr185 proteins upon amino acid starvation by using a specific antibody. Figure 4A shows that phosphorylation of JNK proteins was enhanced by 1 to 4 h of leucine starvation, demonstrating that JNK

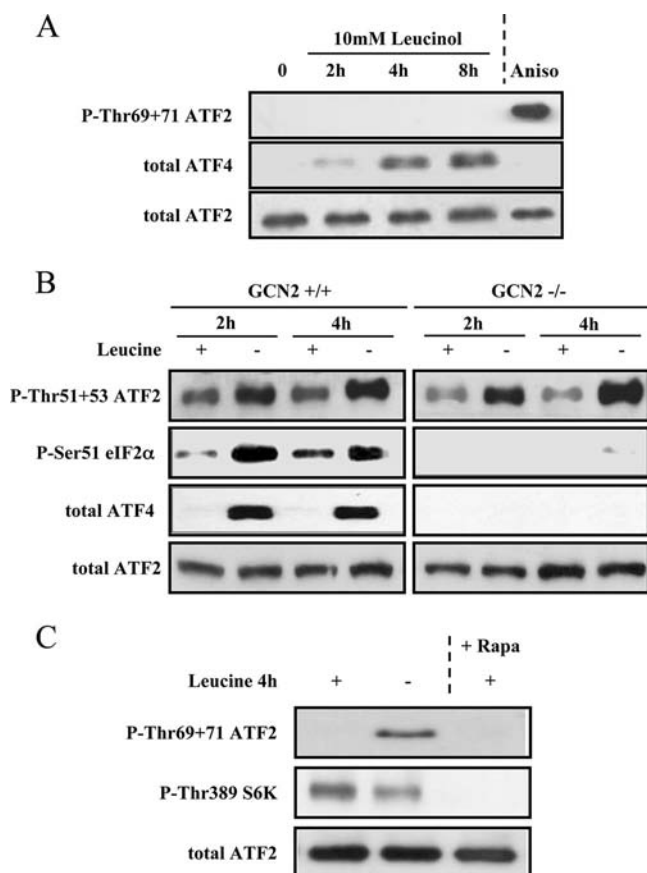


FIG. 2. ATF2 phosphorylation upon leucine starvation does not involve the GCN2 and mTORC1 pathways. (A) Cells were incubated with 10 mM leucinol for the indicated times, and then ATF2 phosphorylation and ATF4 expression were analyzed as previously described. A 30-minute incubation with 20  $\mu$ g/ml anisomycin (Aniso) was used as a positive control for the measurement of ATF2 phosphorylation. (B) GCN2<sup>+/+</sup> or GCN2<sup>-/-</sup> MEF were incubated in either control or leucine-free medium for 2 and 4 h. Cells were then harvested for analysis of ATF4 expression and phosphorylation of ATF2 and eIF-2 $\alpha$ . (C) Cells were leucine starved for 4 h or treated with 50 nM rapamycin (Rapa) for 4 h, and then the phosphorylations of ATF2 and S6K were measured.

phosphorylation matches the time course of ATF2 phosphorylation.

JNK proteins are encoded by three genes. The *jnk1* and *jnk2* genes are expressed ubiquitously, whereas the *jnk3* gene has a limited pattern of expression, mainly restricted to the brain, heart, and testis (20). To examine which JNK isoform is involved in amino acid regulation of ATF2 phosphorylation, HeLa cells were transfected with siRNA to silence JNK1, JNK2, or both JNK1 and JNK2. We monitored the effectiveness of the siRNA action by immunoblot analysis, using antibodies that recognize JNK1 or JNK2 specifically. Figure 4B shows that siRNA treatment was effective in dramatically reducing the corresponding target expression relative to the level for the control siRNA. These results reveal that knockdown of JNK2 but not JNK1 abolished ATF2 phosphorylation on Thr71 in response to leucine starvation but that ATF4 induction was not affected. We obtained similar results when mea-

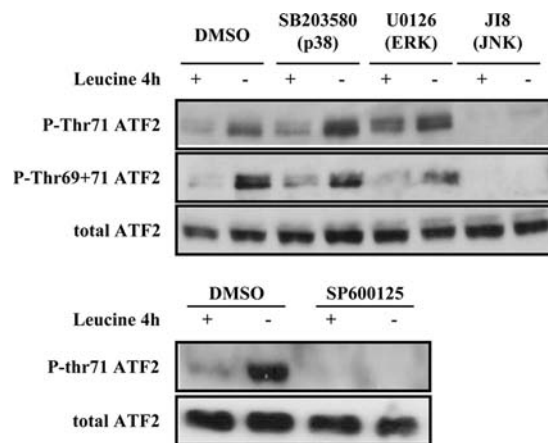


FIG. 3. Pharmacological inhibition of JNK prevents ATF2 phosphorylation by leucine starvation. Cells were incubated in either control or leucine-free medium for 4 hours in the presence of various MAPK inhibitors (20  $\mu$ M SB203580 inhibits p38, 50  $\mu$ M U0126 inhibits MEK1/2 and thus ERK, and 20  $\mu$ M J18 and 50  $\mu$ M SP600125 inhibit JNK). The phosphorylation of ATF2 was then measured. For this experiment, cells were first preincubated for 1 h with MAPK inhibitors or vehicle (dimethyl sulfoxide [DMSO]).

suring ATF2 phosphorylation on ATF2 Thr69+Thr71 (data not shown).

**A cascade of protein kinases including MKK7 and MEKK1 mediates leucine starvation-induced ATF2 phosphorylation.** We next analyzed which known JNK2 activator(s) (MKK4, MKK7, or both) was involved in response to leucine starvation. Cells were transfected with siRNA targeting MKK4, MKK7, or both, and the experiment was performed as described for Fig. 4B. Figure 5A shows that siRNA treatment (i) was effective in reducing the expression of the corresponding target and (ii) did not prevent ATF4 induction upon leucine starvation. Moreover, it was clear that MKK7 knockdown completely abolished ATF2 phosphorylation in response to leucine starvation. Conversely, in MKK4-silenced cells, leucine-dependent phosphorylation of ATF2 was maintained.

MKK7 activity was increased following phosphorylation at Ser and Thr residues within a SKAKT motif in its activation loop by multiple kinases, including MEKK1 to -4, the protein kinase of the mixed-lineage family (MLK1 to -3), apoptosis signal-regulated kinase 1 (ASK1), dual-leucine-zipper-bearing kinase, and transforming growth factor  $\beta$ -activated kinase 1 (TAK1). According to the literature, the properties of certain kinases meant we did not consider them to be potential candidates for activation of MKK7 by amino acid starvation. First, PAK1, dual-leucine-zipper-bearing kinase, MLK1, and MLK2 expressions are restricted to a limited number of tissues and are either not expressed or poorly expressed in HeLa cells (9, 36). Second, several studies showed that MLK2, PAK1, ASK1, TAK1, or MEKK4 activity predominantly phosphorylates MKK4 rather than MKK7 (1, 15, 18, 38, 48, 51). Therefore, we first investigated whether MEKK1, MEKK2, and MEKK3 were involved in the signaling pathway linking leucine deprivation to ATF2 phosphorylation. Cells were transfected with specific siRNA to silence MEKK1, MEKK2, MEKK3, or all three proteins. Figure 5B shows that MEKK1 knockdown abolishes ATF2 phosphorylation resulting from leucine starvation while the



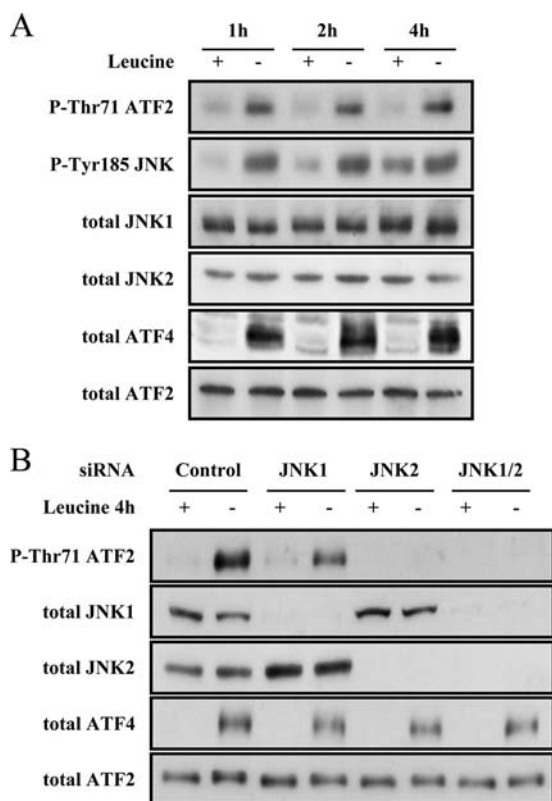


FIG. 4. Silencing of JNK2 by siRNA prevents ATF2 phosphorylation by leucine starvation. (A) Cells were incubated in either control or leucine-free medium and harvested after the indicated incubation times. The phosphorylated forms of JNK (Tyr185) and ATF2 were measured. Each blot was obtained from a representative experiment among three independent experiments. (B) HeLa cells were transfected with control siRNA, JNK1 siRNA, JNK2 siRNA, or siRNA targeting both JNK1 and JNK2, as described in Materials and Methods. At 72 h posttransfection, cells were incubated in either DMEM or leucine-free DMEM for 4 h and then harvested for analysis of ATF2, JNK1, JNK2, ATF4, and the phosphorylated form of ATF2. Each blot was obtained from a representative experiment among three independent experiments.

GCN2/ATF4 pathway is not affected. Conversely, MEKK2 or MEKK3 silencing had no effect. Finally, we next confirm the role of JNK in this amino acid-regulated pathway. Figure 5C shows that JNK phosphorylation in response to leucine starvation is prevented by MKK7 and MEKK1 silencing.

Taken together, our results demonstrate that amino acid starvation triggered a cascade of protein kinases that includes MKK7 and MEKK1 and mediated JNK2 activation and subsequent ATF2 phosphorylation.

**Leucine starvation-induced ATF2 phosphorylation requires both Cdc42 and Rac1.** Several lines of evidence indicate that the Rho family of GTPases mediates activation of the JNK pathway in response to various stimuli (10, 20). Particularly, it has been shown that Rac1 and Cdc42 play a critical role in controlling the JNK signaling pathway (17). In addition, these small GTPases appear to transmit signals to the JNK module via MEKK1 (for a review, see reference 29). Taken together, these data prompted us to investigate the role of Cdc42 and Rac1 in our model. Cells were transfected with specific siRNA targeting either Cdc42 or Rac1 or both Cdc42 and Rac1. We

first checked that each siRNA had silenced its target gene (Fig. 6). Our results show that silencing of Rac1 or Cdc42 dramatically decreased but did not abolish ATF2 phosphorylation upon leucine starvation. However, knockdown of both Cdc42 and Rac1 completely abolished the response to leucine deprivation with respect to ATF2 phosphorylation while ATF4 induction was not affected. From these experiments, we can conclude that (i) these two GTPases are required to trigger full phosphorylation of ATF2 upon leucine starvation and that (ii) there is partial functional redundancy between Cdc42 and Rac1.

**Gα12 knockdown prevents leucine starvation-induced ATF2 phosphorylation.** In mammalian cells, members of the Rho GTPase family are positioned at the center of a complex signaling network. Diverse upstream signals can regulate Rho GTPase through activation of various receptors, such as G protein-coupled receptor (GPCR) or receptor tyrosine kinase (73, 74). Since amino acids have already been shown to activate GPCR (16), we favor the hypothesis that a GPCR could be involved in the sensing of leucine deficiency. So we focused our investigation on the role of G proteins. Among the G protein alpha or beta-gamma subunits, Gα12 and Gα13 have been shown to be able to activate the JNK pathway (29, 76). For Fig. 7A, we investigated the role of Gα12 and Gα13 in the regulation of ATF2 phosphorylation by leucine starvation. We silenced Gα12, Gα13, or both Gα12 and Gα13 by transfecting appropriate siRNA. First, we observed that Gα12 protein silencing decreased the basal level of ATF4 protein expression. Further work beyond the scope of this study will be necessary to identify the role of Gα12 in the regulation of ATF4 expression. More importantly, Fig. 7A shows that knockdown of Gα12 prevents ATF2 phosphorylation but that knockdown of Gα13 has no effect. Furthermore, data from literature showed that the expression of an activated mutant of Gα12 (Gα12 QL) leads to phosphorylation and activation of JNKs specifically through the stimulation of the JNK-specific upstream kinase MKK7 (23, 70). In Fig. 7B, we show that transfection of Gα12 QL in HEK293 cells activates the phosphorylation of ATF2 and JNK. Taken together, these results show that the Gα12 protein is involved in this pathway, suggesting that a GPCR could be at the origin of the sensing of leucine starvation by cells.

**Inhibition of the pathway leading to ATF2 phosphorylation affects the regulation of ATF3 expression in response to amino acid starvation.** To assess the role of the JNK pathway in amino acid regulation of gene expression, we first measured the effect of leucine starvation on ATF3 mRNA content in the context of JNK2 or JNK1 silencing. The experiment was performed as described in the legend to Fig. 4. Our results (Fig. 8A) show that JNK2-siRNA transfection decreased ATF3 mRNA induction significantly by leucine starvation but that JNK1-siRNA and control siRNA had no effect. It was previously shown that ASNS is transcriptionally regulated by leucine starvation through an AARE that does not require ATF2 binding (this point will be evoked in Discussion) (12). As negative control, we show that the amino acid regulation of ASNS is not affected by JNK2-siRNA treatment. Second, we focused our investigation on the impact of JNK1 or JNK2 silencing on AARE-dependent transcription. Cells were transiently transfected with one siRNA together with a vector encoding Luc driven by two copies of the *ATF3* AARE. Figure 8B shows that



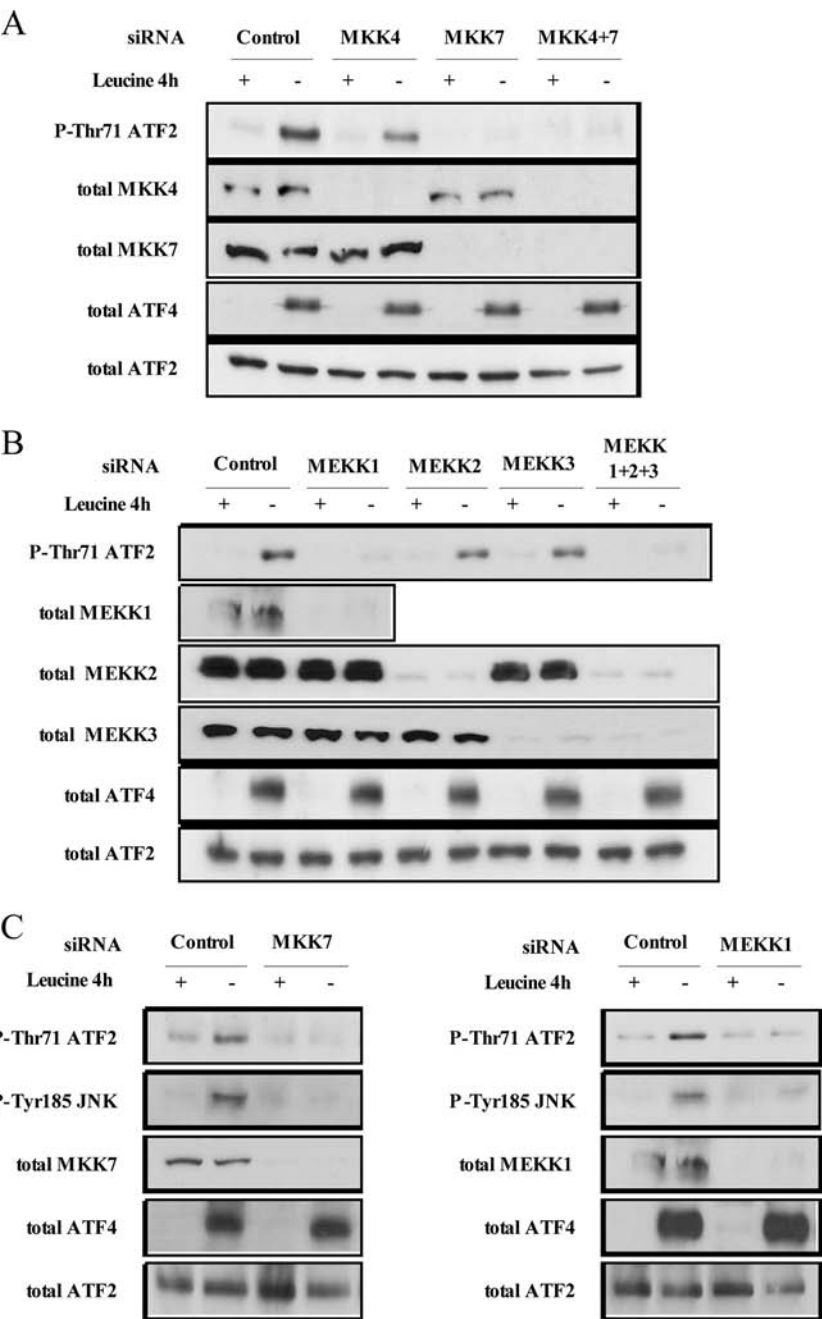


FIG. 5. Knockdown of MKK7 or MEKK1 inhibits leucine starvation-induced ATF2 phosphorylation. (A) HeLa cells were transfected with either control siRNA, MKK4 siRNA, MKK7 siRNA, or both MKK4 siRNA and MKK7 siRNA. At 72 h posttransfection, cells were incubated in either DMEM or leucine-free DMEM for 4 h. Cells were then harvested for analysis of MKK4, MKK7, ATF4, and the phosphorylated form of ATF2 as previously described. (B) MEKK1, MEKK2, MEKK3, or all three proteins were silenced as previously described. Then, the expression levels of MEKK1, MEKK2, MEKK3, ATF4, and the phosphorylated form of ATF2 were analyzed. (C) Protein extracts from cells transfected with either control, MKK7, or MEKK1 siRNA were analyzed for JNK phosphorylation. Each blot was obtained from a representative experiment among three independent experiments.

the increase of the *ATF3* AARE-dependent transcription upon leucine starvation was affected by the JNK2-siRNA but not by the JNK1 or control siRNA. Our previous article (12) demonstrates that, like *ATF3*, the amino acid-regulated transcription of the *CHOP* gene requires the expression of ATF2. Figure 8B shows that the *CHOP* AARE-dependent transcription is also affected by transfection of JNK2-siRNA, demonstrating that

the necessity of ATF2 phosphorylation is not restricted to the regulation of ATF3 expression. Data from Fig. 4B and 5A show that silencing JNK1 or MKK4 leads to a slight decrease in induction of ATF2 phosphorylation upon leucine starvation; however, it does not affect AARE-dependent transcription and *ATF3* expression (Fig. 8) (data not shown for MKK4 silencing). The latter observation shows that the

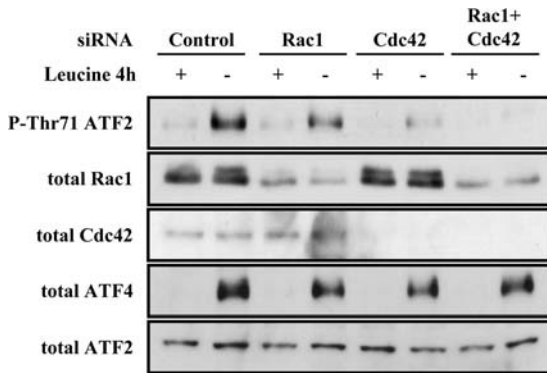


FIG. 6. Silencing of Cdc42 and Rac1 prevents ATF2 phosphorylation in response to leucine starvation. Rac1, Cdc42, or both were silenced as previously described. The phosphorylated form of ATF2 and the expression of Rac1, Cdc42, and ATF4 were measured. Each blot was obtained from a representative experiment among four independent experiments.

signaling pathway connecting amino acid starvation to phosphorylation of ATF2 protein bound on the AARE involves MKK7 rather than MKK4 and JNK2 rather than JNK1.

Finally, we investigated whether inhibition of one of the

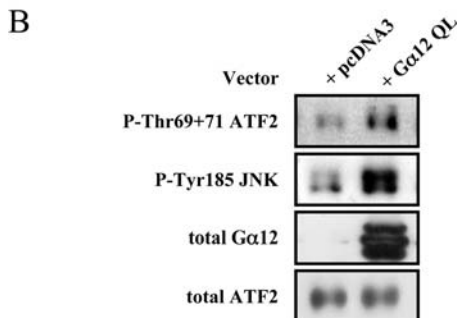
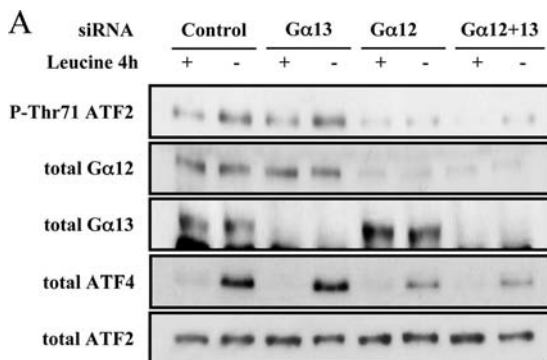


FIG. 7. Involvement of the Gα12 protein in leucine starvation-induced ATF2 phosphorylation. HeLa cells were transfected with either control siRNA, Gα12 siRNA, Gα13 siRNA, or both Gα12 siRNA and Gα13 siRNA. At 72 h posttransfection, cells were incubated in either DMEM or leucine-free DMEM for 4 h. Cells were then harvested for analysis of Gα12, Gα13, ATF4, and the phosphorylated form of ATF2 as previously described. Each blot was obtained from a representative experiment among three independent experiments. (B) HEK293 cells were transfected with an activated mutant of Gα12 (Gα12 QL) or empty vector (pcDNA3). At 48 h posttransfection, cells were lysed, then protein was harvested for analysis of Gα12, and the phosphorylated forms of ATF2 and JNK were measured as previously described.

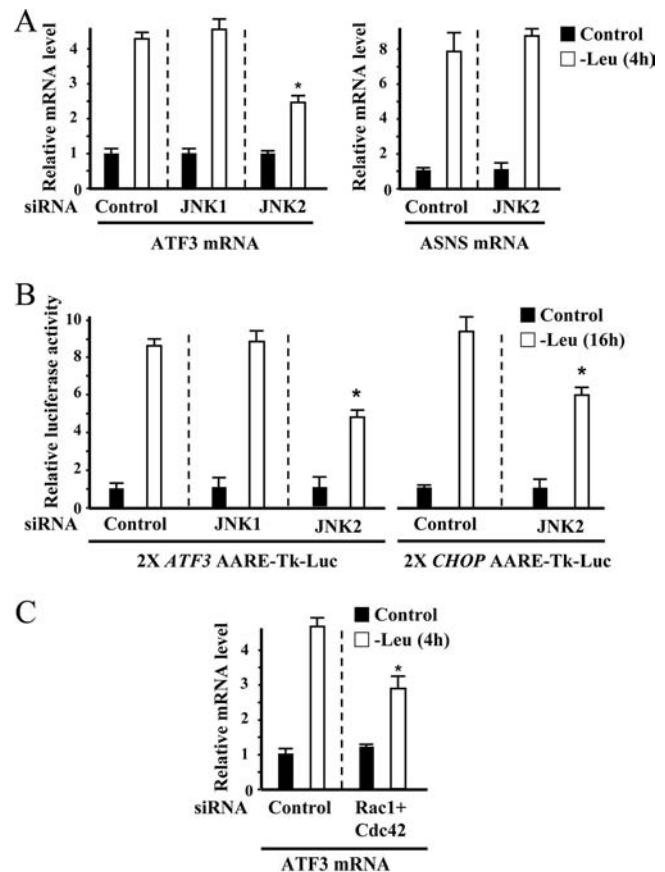


FIG. 8. Role of JNK2 and Rac1/Cdc42 in the transcriptional regulation of ATF3 in response to amino acid starvation. (A) HeLa cells were transfected with control siRNA, JNK1 siRNA, or JNK2 siRNA and then incubated in a control medium or leucine-free medium (-Leu) for 4 h as described for Fig. 4A. Total RNA was then extracted and analyzed by real-time RT-PCR for ATF3 or ASNS mRNA content. (B) Cells were transfected with the appropriate siRNA, together with a reporter plasmid containing two copies of the *ATF3* or *CHOP* AARE inserted 5' to the thymidine kinase promoter driving the Luc gene (2xARE-Tk-Luc). A plasmid encoding β-galactosidase, driven by a cytomegalovirus promoter, was cotransfected to normalize transfection (see Materials and Methods). At 48 h posttransfection, cells were incubated in either DMEM or leucine-free DMEM for 16 h and then harvested to measure Luc activity. (C) HeLa cells were transfected with control siRNA or with Rac1 siRNA and Cdc42 siRNA. Cells were then treated and analyzed as described for panel B. All values are means calculated from the results for at least three independent experiments performed in triplicate. Data are expressed as mean ± standard error of the mean. Statistical analyses were performed using a Student test. Asterisks indicate that -Leu/siRNA-treated cells had statistical significance at *P* values of <0.05 for comparison with the -Leu/control siRNA-treated cells.

upstream steps of the signaling pathway could affect the response to leucine starvation. Since Gα12 protein silencing decreases the basal level of ATF4 protein, it could influence AARE-dependent transcription (Fig. 7). In consequence, we chose to measure the impact of Rac1-Cdc42 knockdown on regulation of ATF3 expression upon leucine starvation. The experiment was performed as described for Fig. 8A and B. Our results (Fig. 8C) show that silencing of Rac1 together with Cdc42 affects induction of *ATF3* mRNA in response to leucine starvation.

These data clearly show that inhibition of ATF2 phosphorylation by siRNA targeting of upstream components of the signaling pathway impairs induction of ATF3 by amino acid starvation. However, Fig. 1 and previous results (12) show that ATF2 knockout almost abolishes the regulation of ATF3 upon amino acid deprivation. The most plausible hypothesis by which to explain these data could be that inhibition of the G $\alpha$ 12/JNK pathway by siRNA does not totally inhibit phosphorylation of the ATF2 molecules bound on the AARE.

Taken together, these results suggest that a signaling pathway involving the G $\alpha$ 12 protein, Rac1/Cdc42, and the JNK module is necessary to fully activate the AARE-dependent transcription in response to amino acid starvation.

## DISCUSSION

Cells respond to the stress of amino acid starvation by activating a gene expression program that either protects them from stress or leads to apoptosis (42, 57, 58). The regulation of *ATF3* gene expression represents a mechanistic model for investigating how changes in amino acid availability regulate transcription. ATF3 is a member of the ATF/CREB transcription factor family, which also includes members of the C/EBP family and Jun/Fos. Normally expressed at low levels in cells, ATF3 expression is rapidly induced in response to various stress signals and is likely to be involved in the control of a number of stress-related responses, including nutrient stress (33, 43). For example, ATF3 is expressed in the islets of mice that have developed diabetes and in human patients with type 1 or type 2 diabetes. It was also shown that ATF3 is a regulator of stress-induced pancreatic  $\beta$ -cell apoptosis (32). The literature clearly shows that two events are required for *ATF3* induction in response to amino acid starvation: ATF4 induction and ATF2 phosphorylation. The data described in our study include several novel observations concerning the signaling pathway by which ATF2 is phosphorylated upon amino acid starvation and then activates gene transcription. We demonstrated that a G $\alpha$ 12 protein-, Rac1/Cdc42-, MEKK1-, MKK7-, and JNK2-dependent pathway is essential for regulation of ATF2 phosphorylation and then *ATF3* induction. The results of this study, together with earlier data, suggest a model where two independent pathways are involved for the activation of AARE-dependent transcription by amino acid availability (Fig. 9). One pathway leads to the induction of ATF4, and the other one leads to the phosphorylation of ATF2.

It was previously shown that the AARE-regulated genes (dependent on ATF4 expression) can be divided into two classes, according to the degree of their ATF2 dependence in eukaryotic cells (2, 68). The first class is composed of genes that are totally ATF2 dependent, such as *ATF3*, *CHOP*, *SARS*, or *4EBP1*. In response to amino acid starvation, phosphorylation of ATF2, subsequent stimulation of the associated histone acetyltransferase activity, and modification of the chromatin structure are a general mechanism involved in transcriptional regulation of the ATF2-dependent genes (12). The second class, consisting of genes such as *ASNS* and *YARS*, is partially ATF2 dependent since the lack of ATF2 decreases but does not abolish amino acid regulation. For these genes, it appears that the increase in histone acetylation resulting from amino acid starvation involves an ATF2-independent histone acetyl-

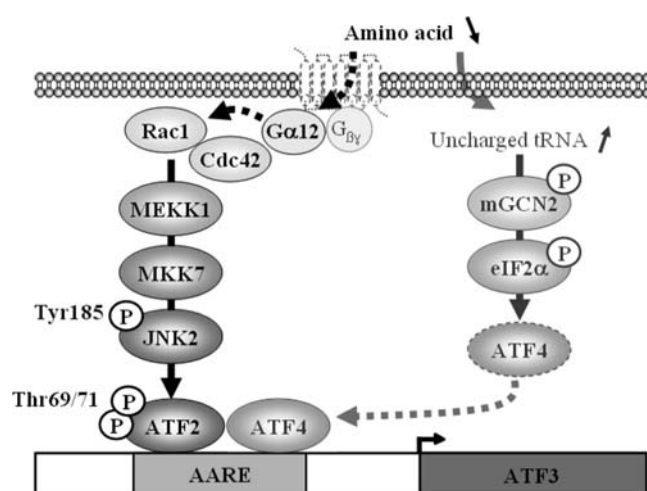


FIG. 9. Model of amino acid starvation-induced AARE-dependent transcription in human cells. In response to amino acid starvation, two pathways are activated. The first one is activated by uncharged tRNA and leads to ATF4 induction. The second one involves the G $\alpha$ 12 protein and leads to ATF2 phosphorylation.

transferase mechanism (14). Such differences in the mechanism of histone acetylation would permit flexibility between amino acid-regulated genes with regard to the rapidity and magnitude of the transcriptional response despite the same initial signal.

**ATF2 phosphorylation results from the activation of a specific signaling cascade by amino acid starvation.** Among the upper components of the signaling pathway, we identified the G $\alpha$ 12 protein and two membrane-associated GTPases, Cdc42 and Rac1. It is notable that knockdown of both Cdc42 and Rac1 is necessary to completely abolish the response to leucine deprivation. Similar data have been reported for other models (17, 62). For example, epidermal growth factor activates both Rac1 and Cdc42 in a synergistic manner to regulate the downstream pathway (50). The observation that multiple GTPases contribute to activation of the JNK module either indicates a simple redundancy or suggests a specific role for each GTPase, depending on the different cellular contexts.

Once activated, Rac1 and Cdc42 can interact with numerous downstream effectors to regulate a diverse set of cellular functions. Our data show that, in response to amino acid starvation, MEKK1 is the downstream effector of Rac1 and Cdc42 in the pathway leading to ATF2 phosphorylation. According to the literature, the mechanisms by which the interactions between Rac1/Cdc42 and their effectors activate the downstream signal transduction pathway are still unclear. For example, multiple Cdc42 downstream effectors (including MEKK1) (27) have the same interaction motif, with similar affinities for binding to active Cdc42. It has been hypothesized that guanine nucleotide exchange factors are a component of the Rac1- or Cdc42-signaling complex and could direct Rac1/Cdc42 to select the specific downstream effector (35, 39, 74).

Downstream from MEKK1, the signaling between amino acid starvation and ATF2 phosphorylation requires MKK7 and JNK2 kinases. Previous data already mentioned the specificity of a given kinase for a given downstream effector leading to the



specificity of a signaling pathway (22). For example, MKK7 activates only JNK, whereas MKK4 activates both JNK and p38 (79, 84). Similarly, the substrate specificities of JNK1 and JNK2 were different. For example, c-Jun was preferentially phosphorylated by JNK1, while ATF2 was preferentially phosphorylated by JNK2 (20). The specificity of the signaling cascade involves the affinity of the kinase for its substrate as well as tissue-specific factors and scaffold proteins (84). For example, it has been shown that JNK-interacting protein 1 (JIP-1) forms a complex with JNK, MKK7, and certain MAPK kinase kinases (25). So the phosphorylation cascade occurs within this protein complex. The factor(s) responsible for the specificity of the pathway at each step has not yet been identified. In particular, the activity of various guanine nucleotide exchange factors such as guanine exchange factor (GEF), GTPase activating protein (GAP), or guanine dissociation inhibitor (GDI) or the role of scaffold proteins (JIP and POSH proteins) in the model of the JNK pathway activation in response to amino acid starvation could be investigated (35, 85, 87).

Recently, it has been shown that, in addition to the JNK pathway, amino acid limitation also activates the kinases MEK and ERK (78). The authors described a complex cross talk between the MEK-ERK signaling pathway and the GCN2/ATF4 pathway. Indeed, activation of the ERK pathway requires eIF-2 $\alpha$  phosphorylation and ATF4 induction, which, in turn, is regulated by ERK activity. Taken together, these data demonstrate that, in addition to the well-described amino acid-regulated kinases (GCN2 and mTORC1), several components of the MAPK pathways are involved in the control of particular cellular functions following amino acid deprivation. The regulatory role of MAPK could depend on the tissue or cell type (78).

**Amino acid starvation-dependent ATF2 phosphorylation involves an unidentified sensor initiated at the cell membrane.** Our results suggest that the amino acid starvation sensor could involve an unidentified GPCR. GPCRs constitute one of the largest and most diverse protein families in mammalian genomes (49). In a recent analysis, more than 800 GPCRs were listed in the human genome (72). Some members of GPCR class 3 are described as broad-spectrum amino acid sensors that couple changes in extracellular-amino-acid levels to the activation of intracellular signaling pathways (16). They include the heterodimeric taste receptor (T1R1 and T1R3), GPCR6A, and the extracellular calcium sensing receptor (CaR). In yeast, a signaling pathway from the plasma membrane to the nucleus is involved in sensing amino acid availability in the environment. Extracellular amino acids are recognized by a receptor at the plasma membrane, the integral membrane protein Ssy1 (7, 28). In association with two other peripheral membrane proteins, Ptr3 and Ssy5, it activates transcription factors Stp1 and Stp2, which regulate the expression of target genes (54).

In mammals, the nature of the upstream amino acid sensor that could activate the JNK pathway in the context of low amino acid concentrations remains to be identified. Several articles report that binding of particular amino acids to their respective transporter proteins could also serve as an effective means of sensing amino acid availability at the cell surface (37). For example, it was reported that leucine and glutamine transporter activity was necessary for the regulation of

mTORC1 by these amino acids (61). However, in this article the authors did not determine the origin of the signal: either the transporter behaves as a receptor (and turns on the pathway) or it allows a high intracellular concentration of amino acid to be maintained, which is sensed by the cell. It is notable that, in addition to leucine starvation, ATF2 phosphorylation is enhanced by starvation for lysine or methionine (Fig. 1D). These amino acids are not transported by a common transporter, suggesting that either (i) the amino acid sensor is not an amino acid carrier or (ii) several amino acid transporters could be connected to a common protein complex that could turn on the downstream signaling pathway. Further work will be necessary to identify the amino acid sensor.

In conclusion, we have identified a new signal transduction pathway activated by amino acid starvation and leading to ATF2 phosphorylation. Our results demonstrate that, in mammalian cells, at least two signaling pathways are activated by amino acid deprivation. (i) The first one senses the intracellular lack of amino acid through the activation of GCN2 and leads to the induction of ATF4. (ii) The other sensor is located at the plasma membrane and leads to the phosphorylation of ATF2 through the activation of the JNK cascade. These two pathways regulate the AARE-dependent transcription and control a set of genes involved in adaptation to amino acid limitation. However, we cannot exclude that these signaling pathways could regulate biological functions other than AARE-dependent transcription. In particular, the role of the JNK module in the adaptation to an amino acid limitation remains to be investigated. Defining the precise cascade of molecular events by which the cellular concentration of an individual amino acid regulates gene expression will be an important contribution to our understanding of metabolite control in mammalian cells. These studies will provide insight into the role of amino acids in the regulation of cellular functions like cell division, protein synthesis, and proteolysis.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank A. Conigrave (University of Sydney, NSW, Australia) for comments and advice. We thank D. Ron (Skirball Institute of Biomolecular Medicine, New York, NY) for giving us the MEF deficient in GCN2 and ATF4, N. Jones (Paterson Institute for Cancer, Manchester, United Kingdom) for the MEF deficient in ATF2, and D. N. Dhanasekaran (Fels Institute for Cancer Research and Molecular Biology, Philadelphia, PA) for the G $\alpha$ 12 QL plasmid.

This work was supported by INRA, CNRS, and Association pour la Recherche sur le Cancer.

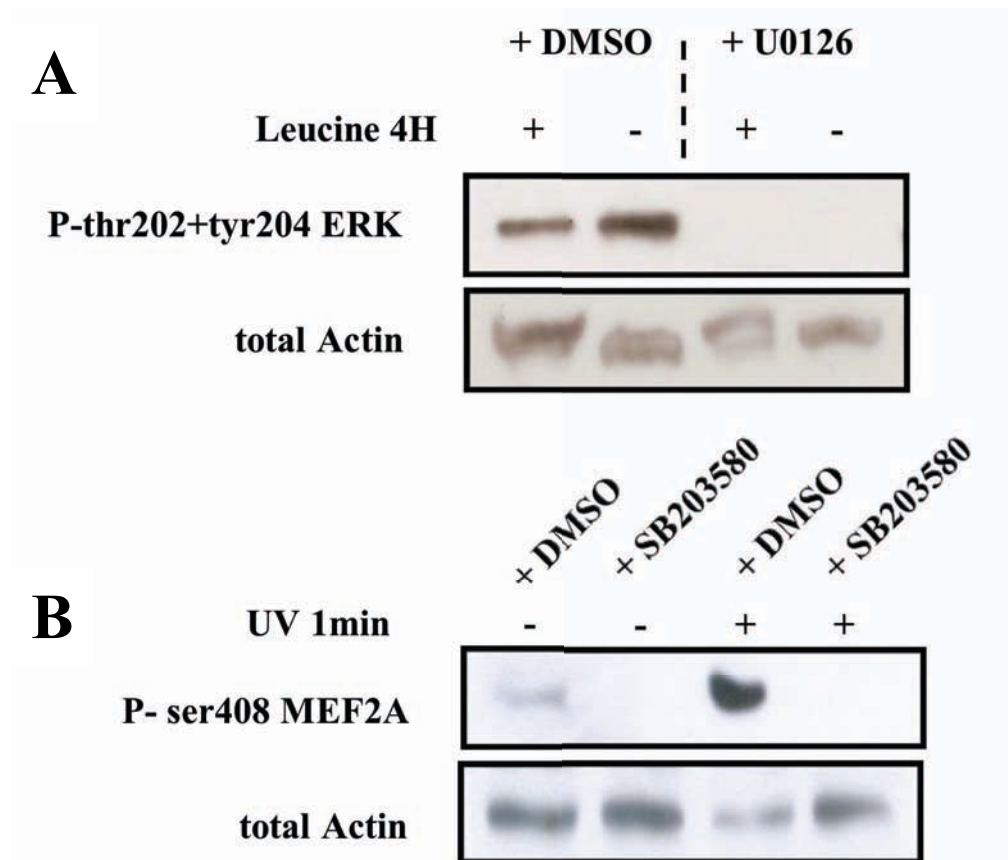
#### REFERENCES

- Almeida, E. A., D. Ilic, Q. Han, C. R. Hauck, F. Jin, H. Kawakatsu, D. D. Schlaepfer, and C. H. Damsky. 2000. Matrix survival signaling: from fibronectin via focal adhesion kinase to c-Jun NH(2)-terminal kinase. *J. Cell Biol.* **149**:741–754.
- Averous, J., A. Bruhat, C. Jousse, V. Carraro, G. Thiel, and P. Fafournoux. 2004. Induction of CHOP expression by amino acid limitation requires both ATF4 expression and ATF2 phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **279**:5288–5297.
- Baan, B., H. van Dam, G. C. van der Zon, J. A. Maassen, and D. M. Ouwens. 2006. The role of c-Jun N-terminal kinase, p38, and extracellular signal-regulated kinase in insulin-induced Thr69 and Thr71 phosphorylation of activating transcription factor 2. *Mol. Endocrinol.* **20**:1786–1795.
- Baertl, J. M., R. P. Placko, and G. G. Graham. 1974. Serum proteins and plasma free amino acids in severe malnutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* **27**:733–742.
- Barbosa-Tessmann, I. P., C. Chen, C. Zhong, F. Siu, S. M. Schuster, H. S. Nick, and M. S. Kilberg. 2000. Activation of the human asparagine synthetase gene by the amino acid response and the endoplasmic reticulum stress response pathways occurs by common genomic elements. *J. Biol. Chem.* **275**:26976–26985.

6. Bennett, B. L., D. T. Sasaki, B. W. Murray, E. C. O'Leary, S. T. Sakata, W. Xu, J. C. Leisten, A. Motiwala, S. Pierce, Y. Satoh, S. S. Bhagwat, A. M. Manning, and D. W. Anderson. 2001. SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:13681–13686.
7. Bernard, F., and B. Andre. 2001. Genetic analysis of the signalling pathway activated by external amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **41**:489–502.
8. Bhoumik, A., and Z. Ronai. 2008. ATF2: a transcription factor that elicits oncogenic or tumor suppressor activities. *Cell Cycle* **7**:2341–2345.
9. Bisson, N., M. Tremblay, F. Robinson, D. R. Kaplan, S. P. Trusko, and T. Moss. 2008. Mice lacking both mixed-lineage kinase genes *Mlk1* and *Mlk2* retain a wild type phenotype. *Cell Cycle* **7**:909–916.
10. Boutros, T., E. Chevet, and P. Metrakos. 2008. Mitogen-activated protein (MAP) kinase/kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer. *Pharmacol. Rev.* **60**:261–310.
11. Breitwieser, W., S. Lyons, A. M. Flenniken, G. Ashton, G. Bruder, M. Willington, G. Lacaud, V. Kouskoff, and N. Jones. 2007. Feedback regulation of p38 activity via ATF2 is essential for survival of embryonic liver cells. *Genes Dev.* **21**:2069–2082.
12. Bruhat, A., Y. Cherasse, A. C. Maurin, W. Breitwieser, L. Parry, C. Deval, N. Jones, C. Jousse, and P. Fafournoux. 2007. ATF2 is required for amino acid-regulated transcription by orchestrating specific histone acetylation. *Nucleic Acids Res.* **35**:1312–1321.
13. Bruhat, A., C. Jousse, V. Carraro, A. M. Reimold, M. Ferrara, and P. Fafournoux. 2000. Amino acids control mammalian gene transcription: activating transcription factor 2 is essential for the amino acid responsiveness of the CHOP promoter. *Mol. Cell. Biol.* **20**:7192–7204.
14. Chen, H., Y. X. Pan, E. E. Dudenhausen, and M. S. Kilberg. 2004. Amino acid deprivation induces the transcription rate of the human asparagine synthetase gene through a timed program of expression and promoter binding of nutrient-responsive bZIP transcription factors as well as localized histone acetylation. *J. Biol. Chem.* **279**:50829–50839.
15. Chi, H., M. R. Sarkisian, P. Rakic, and R. A. Flavell. 2005. Loss of mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4 (MEKK4) results in enhanced apoptosis and defective neural tube development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**:3846–3851.
16. Conigrave, A. D., and D. R. Hampson. 2006. Broad-spectrum L-amino acid sensing by class 3 G-protein-coupled receptors. *Trends Endocrinol. Metab.* **17**:398–407.
17. Coso, O. A., M. Chiariello, J. C. Yu, H. Teramoto, P. Crespo, N. Xu, T. Miki, and J. S. Gutkind. 1995. The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell* **81**:1137–1146.
18. Cuenda, A., and D. S. Dorow. 1998. Differential activation of stress-activated protein kinase kinases SKK4/MKK7 and SKK1/MKK4 by the mixed-lineage kinase-2 and mitogen-activated protein kinase kinase (MKK) kinase-1. *Biochem. J.* **333**:11–15.
19. Davies, S. P., H. Reddy, M. Caivano, and P. Cohen. 2000. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem. J.* **351**:95–105.
20. Davis, R. J. 2000. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* **103**:239–252.
21. Derijard, B., M. Hibi, I. H. Wu, T. Barrett, B. Su, T. Deng, M. Karin, and R. J. Davis. 1994. JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* **76**:1025–1037.
22. Derijard, B., J. Raingeaud, T. Barrett, I. H. Wu, J. Han, R. J. Ulevitch, and R. J. Davis. 1995. Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* **267**:682–685.
23. Dermott, J. M., J. H. Ha, C. H. Lee, and N. Dhanasekaran. 2004. Differential regulation of Jun N-terminal kinase and p38MAP kinase by Galphai2. *Oncogene* **23**:226–232.
24. Deval, C., C. Chaveroux, A. C. Maurin, Y. Cherasse, L. Parry, V. Carraro, D. Milenkovic, M. Ferrara, A. Bruhat, C. Jousse, and P. Fafournoux. 2009. Amino acid limitation regulates the expression of genes involved in several specific biological processes through GCN2-dependent and GCN2-independent pathways. *FEBS J.* **276**:707–718.
25. Dickens, M., J. S. Rogers, J. Cavanagh, A. Raitano, Z. Xia, J. R. Halpern, M. E. Greenberg, C. L. Sawyers, and R. J. Davis. 1997. A cytoplasmic inhibitor of the JNK signal transduction pathway. *Science* **277**:693–696.
26. Fafournoux, P., A. Bruhat, and C. Jousse. 2000. Amino acid regulation of gene expression. *Biochem. J.* **351**:1–12.
27. Fang, G. R., P. Gerwins, C. Widmann, M. B. Jarpe, and G. L. Johnson. 1997. MEKs, GCKs, MLKs, PAKs, TAKs, and tpls: upstream regulators of the c-Jun amino-terminal kinases? *Curr. Opin. Genet. Dev.* **7**:67–74.
28. Forsberg, H., C. F. Gilstring, A. Zargari, P. Martinez, and P. O. Ljungdahl. 2001. The role of the yeast plasma membrane SPS nutrient sensor in the metabolic response to extracellular amino acids. *Mol. Microbiol.* **42**:215–228.
29. Goldsmith, Z. G., and D. N. Dhanasekaran. 2007. G protein regulation of MAPK networks. *Oncogene* **26**:3122–3142.
30. Gupta, S., D. Campbell, B. Derijard, and R. J. Davis. 1995. Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science* **267**:389–393.
31. Harding, H. P., Y. Zhang, H. Zeng, I. Novoa, P. D. Lu, M. Calfon, N. Sadri, C. Yun, B. Popko, R. Paules, D. F. Stojdl, J. C. Bell, T. Hettmann, J. M. Leiden, and D. Ron. 2003. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol. Cell* **11**:619–633.
32. Hartman, M. G., D. Lu, M. L. Kim, G. J. Kociba, T. Shukri, J. Buteau, X. Wang, W. L. Frankel, D. Guttridge, M. Prentki, S. T. Grey, D. Ron, and T. Hai. 2004. Role for activating transcription factor 3 in stress-induced  $\beta$ -cell apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* **24**:5721–5732.
33. Hashimoto, Y., C. Zhang, J. Kawauchi, I. Imoto, M. T. Adachi, J. Inazawa, T. Amagasa, T. Hai, and S. Kitajima. 2002. An alternatively spliced isoform of transcriptional repressor ATF3 and its induction by stress stimuli. *Nucleic Acids Res.* **30**:2398–2406.
34. Hayakawa, J., S. Mittal, Y. Wang, K. S. Korkmaz, E. Adamson, C. English, M. Ohmichi, M. McClelland, and D. Mercola. 2004. Identification of promoters bound by c-Jun/ATF2 during rapid large-scale gene activation following genotoxic stress. *Mol. Cell* **16**:521–535.
35. Heasman, S. J., and A. J. Ridley. 2008. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**:690–701.
36. Hirai, S., A. Kawaguchi, J. Suenaga, M. Ono, D. F. Cui, and S. Ohno. 2005. Expression of MUK/DLK/ZPK, an activator of the JNK pathway, in the nervous systems of the developing mouse embryo. *Gene Expr. Patterns* **5**:517–523.
37. Hundal, H. S., and P. M. Taylor. 2009. Amino acid transceptors: gate keepers of nutrient exchange and regulators of nutrient signaling. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **296**:E603–E613.
38. Ichijo, H., E. Nishida, K. Irie, P. ten Dijke, M. Saitoh, T. Moriguchi, M. Takagi, K. Matsumoto, K. Miyazono, and Y. Gotoh. 1997. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science* **275**:90–94.
39. Itoh, R. E., E. Kiyokawa, K. Aoki, T. Nishioka, T. Akiyama, and M. Matsuda. 2008. Phosphorylation and activation of the Rac1 and Cdc42 GEF Asef in A431 cells stimulated by EGF. *J. Cell Sci.* **121**:2635–2642.
40. Jackson, A. A., and M. S. Grimble. 1990. The malnourished child, vol. 19. Raven Press, Vevey, Switzerland.
41. Jeevanandam, M., G. D. Horowitz, S. F. Lowry, and M. F. Brennan. 1984. Cancer cachexia and protein metabolism. *Lancet* **i**(8392):1423–1426.
42. Jiang, H. Y., and R. C. Wek. 2005. Phosphorylation of the alpha-subunit of the eukaryotic initiation factor-2 (eIF2alpha) reduces protein synthesis and enhances apoptosis in response to proteasome inhibition. *J. Biol. Chem.* **280**:14189–14202.
43. Jiang, H. Y., S. A. Wek, B. C. McGrath, D. Lu, T. Hai, H. P. Harding, X. Wang, D. Ron, D. R. Cavener, and R. C. Wek. 2004. Activating transcription factor 3 is integral to the eukaryotic initiation factor 2 kinase stress response. *Mol. Cell. Biol.* **24**:1365–1377.
44. Jousse, C., J. Averous, A. Bruhat, V. Carraro, S. Mordier, and P. Fafournoux. 2004. Amino acids as regulators of gene expression: molecular mechanisms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **313**:447–452.
45. Jousse, C., C. Deval, A. C. Maurin, L. Parry, Y. Cherasse, C. Chaveroux, R. Lefloch, P. Lenormand, A. Bruhat, and P. Fafournoux. 2007. TRB3 inhibits the transcriptional activation of stress-regulated genes by a negative feedback on the ATF4 pathway. *J. Biol. Chem.* **282**:15851–15861.
46. Kawai, T., J. Fan, K. Mazan-Mamczarz, and M. Gorospe. 2004. Global mRNA stabilization preferentially linked to translational repression during the endoplasmic reticulum stress response. *Mol. Cell. Biol.* **24**:6773–6787.
47. Kilberg, M. S., Y. X. Pan, H. Chen, and V. Leung-Pineda. 2005. Nutritional control of gene expression: how mammalian cells respond to amino acid limitation. *Annu. Rev. Nutr.* **25**:59–85.
48. Kim, E. K., K. T. Noh, J. H. Yoon, J. H. Cho, K. W. Yoon, G. Dreyfuss, and E. J. Choi. 2007. Positive regulation of ASK1-mediated c-Jun NH(2)-terminal kinase signaling pathway by the WD-repeat protein Gemin5. *Cell Death Differ.* **14**:1518–1528.
49. Kroeze, W. K., D. J. Sheffler, and B. L. Roth. 2003. G-protein-coupled receptors at a glance. *J. Cell Sci.* **116**:4867–4869.
50. Kurokawa, K., R. E. Itoh, H. Yoshizaki, Y. O. Nakamura, and M. Matsuda. 2004. Coactivation of Rac1 and Cdc42 at lamellipodia and membrane ruffles induced by epidermal growth factor. *Mol. Biol. Cell* **15**:1003–1010.
51. Li, M. G., K. Katsura, H. Nomiya, K. Komaki, J. Ninomiya-Tsuji, K. Matsumoto, T. Kobayashi, and S. Tamura. 2003. Regulation of the interleukin-1-induced signaling pathways by a novel member of the protein phosphatase 2C family (PP2Cepsilon). *J. Biol. Chem.* **278**:12013–12021.
52. Liao, X. H., A. Majithia, X. Huang, and A. R. Kimmel. 2008. Growth control via TOR kinase signaling, an intracellular sensor of amino acid and energy availability, with crosstalk potential to proline metabolism. *Amino Acids* **35**:761–770.
53. Livingston, C., G. Patel, and N. Jones. 1995. ATF-2 contains a phosphorylation-dependent transcriptional activation domain. *EMBO J.* **14**:1785–1797.
54. Ljungdahl, P. O. 2009. Amino-acid-induced signalling via the SPS-sensing pathway in yeast. *Biochem. Soc. Trans.* **37**:242–247.
55. Lopez, A. B., C. Wang, C. C. Huang, I. Yaman, Y. Li, K. Chakravarty, P. F. Johnson, C. M. Chiang, M. D. Snider, R. C. Wek, and M. Hatzoglou. 2007. A feedback transcriptional mechanism controls the level of the arginine/

- lysine transporter cat-1 during amino acid starvation. *Biochem. J.* **402**:163–173.
56. Lu, P. D., H. P. Harding, and D. Ron. 2004. Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. *J. Cell Biol.* **167**:27–33.
  57. Lu, P. D., C. Jousse, S. J. Marciniak, Y. Zhang, I. Novoa, D. Scheuner, R. J. Kaufman, D. Ron, and H. P. Harding. 2004. Cytoprotection by pre-emptive conditional phosphorylation of translation initiation factor 2. *EMBO J.* **23**:169–179.
  58. Marciniak, S. J., C. Y. Yun, S. Oyadomari, I. Novoa, Y. Zhang, R. Jungreis, K. Nagata, H. P. Harding, and D. Ron. 2004. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* **18**:3066–3077.
  59. Maurin, A. C., C. Jousse, J. Averous, L. Parry, A. Bruhat, Y. Cherasse, H. Zeng, Y. Zhang, H. P. Harding, D. Ron, and P. Fafournoux. 2005. The GCN2 kinase biases feeding behavior to maintain amino acid homeostasis in omnivores. *Cell Metab.* **1**:273–277.
  60. Morton, S., R. J. Davis, and P. Cohen. 2004. Signalling pathways involved in multisite phosphorylation of the transcription factor ATF-2. *FEBS Lett.* **572**:177–183.
  61. Nicklin, P., P. Bergman, B. Zhang, E. Triantafellow, H. Wang, B. Nyfeler, H. Yang, M. Hild, C. Kung, C. Wilson, V. E. Myer, J. P. MacKeigan, J. A. Porter, Y. K. Wang, L. C. Cantley, P. M. Finan, and L. O. Murphy. 2009. Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell* **136**:521–534.
  62. Nicola, C., P. K. Lala, and C. Chakraborty. 2008. Prostaglandin E2-mediated migration of human trophoblast requires RAC1 and CDC42. *Biol. Reprod.* **78**:976–982.
  63. Ogino, T., M. Ozaki, M. Hosako, M. Omori, S. Okada, and A. Matsukawa. 2009. Activation of c-Jun N-terminal kinase is essential for oxidative stress-induced Jurkat cell apoptosis by monochloramine. *Leuk. Res.* **33**:151–158.
  64. Ornatsky, O. I., D. M. Cox, P. Tangirala, J. J. Andreucci, Z. A. Quinn, J. L. Wrana, R. Prywes, Y. T. Yu, and J. C. McDermott. 1999. Post-translational control of the MEF2A transcriptional regulatory protein. *Nucleic Acids Res.* **27**:2646–2654.
  65. Ouwers, D. M., N. D. de Ruiter, G. C. van der Zon, A. P. Carter, J. Schouten, C. van der Burg, K. Kooistra, J. L. Bos, J. A. Maassen, and H. van Dam. 2002. Growth factors can activate ATF2 via a two-step mechanism: phosphorylation of Thr71 through the Ras-MEK-ERK pathway and of Thr69 through RalGDS-Src-p38. *EMBO J.* **21**:3782–3793.
  66. Palii, S. S., H. Chen, and M. S. Kilberg. 2004. Transcriptional control of the human sodium-coupled neutral amino acid transporter system A gene by amino acid availability is mediated by an intronic element. *J. Biol. Chem.* **279**:3463–3471.
  67. Palii, S. S., C. E. Kays, C. Deval, A. Bruhat, P. Fafournoux, and M. S. Kilberg. 2009. Specificity of amino acid regulated gene expression: analysis of genes subjected to either complete or single amino acid deprivation. *Amino Acids* **37**:79–88.
  68. Pan, Y. X., H. Chen, M. M. Thiaville, and M. S. Kilberg. 2007. Activation of the ATF3 gene through a co-ordinated amino acid-sensing response programme that controls transcriptional regulation of responsive genes following amino acid limitation. *Biochem. J.* **401**:299–307.
  69. Peng, T., T. R. Golub, and D. M. Sabatini. 2002. The immunosuppressant rapamycin mimics a starvation-like signal distinct from amino acid and glucose deprivation. *Mol. Cell. Biol.* **22**:5575–5584.
  70. Prasad, M. V., J. M. Dermott, L. E. Heasley, G. L. Johnson, and N. Dhanasekaran. 1995. Activation of Jun kinase/stress-activated protein kinase by GTPase-deficient mutants of G alpha 12 and G alpha 13. *J. Biol. Chem.* **270**:18655–18659.
  71. Proud, C. G. 2007. Signalling to translation: how signal transduction pathways control the protein synthetic machinery. *Biochem. J.* **403**:217–234.
  72. Regard, J. B., I. T. Sato, and S. R. Coughlin. 2008. Anatomical profiling of G protein-coupled receptor expression. *Cell* **135**:561–571.
  73. Schiller, M. R. 2006. Coupling receptor tyrosine kinases to Rho GTPases—GEFs what's the link. *Cell. Signal.* **18**:1834–1843.
  74. Sinha, S., and W. Yang. 2008. Cellular signaling for activation of Rho GTPase Cdc42. *Cell. Signal.* **20**:1927–1934.
  75. Siu, F., P. J. Bain, R. LeBlanc-Chaffin, H. Chen, and M. S. Kilberg. 2002. ATF4 is a mediator of the nutrient-sensing response pathway that activates the human asparagine synthetase gene. *J. Biol. Chem.* **277**:24120–24127.
  76. Suzuki, N., N. Hajicek, and T. Kozasa. 2009. Regulation and physiological functions of G12/13-mediated signaling pathways. *Neurosignals* **17**:55–70.
  77. Szczepankiewicz, B. G., C. Kosogof, L. T. Nelson, G. Liu, B. Liu, H. Zhao, M. D. Serby, Z. Xin, M. Liu, R. J. Gum, D. L. Haasch, S. Wang, J. E. Clampton, E. F. Johnson, T. H. Lubben, M. A. Stashko, E. T. Olejniczak, C. Sun, S. A. Dorwin, K. Haskins, C. Abad-Zapatero, E. H. Fry, C. W. Hutchins, H. L. Sham, C. M. Rondinone, and J. M. Trevillyan. 2006. Aminopyridine-based c-Jun N-terminal kinase inhibitors with cellular activity and minimal cross-kinase activity. *J. Med. Chem.* **49**:3563–3580.
  78. Thiaville, M. M., Y. X. Pan, A. Gjymishka, C. Zhong, R. J. Kaufman, and M. S. Kilberg. 2008. MEK signaling is required for phosphorylation of eIF2alpha following amino acid limitation of HepG2 human hepatoma cells. *J. Biol. Chem.* **283**:10848–10857.
  79. Tournier, C., A. J. Whitmarsh, J. Cavanagh, T. Barrett, and R. J. Davis. 1997. Mitogen-activated protein kinase kinase 7 is an activator of the c-Jun NH2-terminal kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:7337–7342.
  80. van Dam, H., D. Wilhelm, I. Herr, A. Steffen, P. Herrlich, and P. Angel. 1995. ATF-2 is preferentially activated by stress-activated protein kinases to mediate c-jun induction in response to genotoxic agents. *EMBO J.* **14**:1798–1811.
  81. Vatter, K. M., and R. C. Wek. 2004. Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:11269–11274.
  82. Vlahopoulos, S. A., S. Logotheti, D. Mikas, A. Giarika, V. Gorgoulis, and V. Zoumpourlis. 2008. The role of ATF-2 in oncogenesis. *Bioessays* **30**:314–327.
  83. Wang, X., A. Beugnet, M. Murakami, S. Yamanaka, and C. G. Proud. 2005. Distinct signaling events downstream of mTOR cooperate to mediate the effects of amino acids and insulin on initiation factor 4E-binding proteins. *Mol. Cell. Biol.* **25**:2558–2572.
  84. Wang, X., A. Destrument, and C. Tournier. 2007. Physiological roles of MKK4 and MKK7: insights from animal models. *Biochim. Biophys. Acta* **1773**:1349–1357.
  85. Whitmarsh, A. J. 2006. The JIP family of MAPK scaffold proteins. *Biochem. Soc. Trans.* **34**:828–832.
  86. Wolfe, R. R., F. Jahoor, and W. H. Hartl. 1989. Protein and amino acid metabolism after injury. *Diabetes Metab. Rev.* **5**:149–164.
  87. Xu, Z., N. V. Kukekov, and L. A. Greene. 2003. POSH acts as a scaffold for a multiprotein complex that mediates JNK activation in apoptosis. *EMBO J.* **22**:252–261.
  88. Zhao, M., L. New, V. V. Kravchenko, Y. Kato, H. Gram, F. di Padova, E. N. Olson, R. J. Ulevitch, and J. Han. 1999. Regulation of the MEF2 family of transcription factors by p38. *Mol. Cell. Biol.* **19**:21–30.
  89. Ziegler, T. R., C. Gatzert, and D. W. Wilmore. 1994. Strategies for attenuating protein-catabolic responses in the critically ill. *Annu. Rev. Med.* **45**:459–480.





**Supplementary data S1: Verification of the activity of MEK1/2 and p38 inhibitors.** Measuring the phosphorylated form of ERK was used to check U0126 activity. Figure S1A shows that leucine starvation increase ERK activity as previously described. In presence of U0126, ERK phosphorylation is totally prevented. The inhibitor of p38 was checked by measuring the phosphorylated form of MEF2A. According to the literature, MEF2A is mainly phosphorylated by p38 and not by ERK or JNK (see references in the text). To check the p38 inhibitor, cells were first exposed 1 minute to UV light, in presence or not of SB203580. Figure S1B shows that exposition to UV light dramatically increase the MEF2A phosphorylation through p38 activation. In the presence of SB203580, MEF2A phosphorylation is prevented.

## **5. Résultats**

### **5.1. ATF2 est essentiel à la transcription AARE-dépendante d'ATF3**

Les premiers résultats de cette publication montrent l'aspect essentiel des facteurs ATF2 et ATF4 lors de l'induction de la transcription AARE-dépendante du gène ATF3 par la carence en acides aminés. Ainsi l'induction d'ATF3 par la carence en leucine est abolie dans les cellules ATF4<sup>-/-</sup> et ATF2<sup>-/-</sup>. De plus, des expériences de ChIP confirment la liaison d'ATF4 à l'AARE d'ATF3 au cours de cette carence. On remarque que sur cette même séquence, ATF2 est constitutivement fixé et qu'il est phosphorylé sur la thréonine 71 (Thr71) en réponse à une carence en acides aminés. Ces propriétés d'ATF2 sont conservées dans le contexte de cellules ATF4<sup>-/-</sup>. De même, ATF4 est capable de transloquer dans le noyau et de lier cet AARE dans les cellules invalidées pour ATF2. Ces résultats montrent qu'ATF4 et ATF2 sont indispensables pour l'induction d'ATF3 au cours d'une carence en acides aminés mais suggèrent ces deux facteurs sont régulés indépendamment l'un de l'autre.

### **5.2. La phosphorylation d'ATF2 est indépendante des voies mGCN2 et mTORC1**

Les expériences réalisées avec un inhibiteur de la leucyl-tRNA synthétase montrent que la phosphorylation d'ATF2 est indépendante de l'induction d'ATF4. En effet, le traitement au leucinol provoque l'activation de la voie mGCN2/ATF4 alors qu'il n'induit pas la phosphorylation d'ATF2. De la même manière, dans un contexte cellulaire invalidé pour l'expression de mGCN2, on observe la conservation de la phosphorylation d'ATF2 en réponse à la carence en leucine

Enfin, la carence en acides aminés régule l'activité de mTORC1. Nous avons donc voulu déterminer si la répression de cette kinase pouvait influencer la phosphorylation d'ATF2. Ainsi, l'utilisation de la rapamycine, inhibiteur spécifique de mTORC1 et mimétique de l'effet d'une carence en acides aminés sur l'activité de cette kinase, n'induit pas la phosphorylation d'ATF2. Ceci suggère donc que la voie mTOR n'est pas impliquée dans la régulation de la phosphorylation d'ATF2.

Pris dans son ensemble, ces résultats permettent de conclure définitivement sur l'aspect mGCN2 et mTORC1-indépendant de ce mécanisme.



### **5.3. ATF2 est phosphorylé sur les résidus thréonines 69 et 71 en réponse à la carence en leucine**

Nous avons pu déterminer que la phosphorylation d'ATF2 en réponse à la carence en acides aminés ne se limitait pas uniquement à la régulation du phospho-site thr71. L'utilisation d'un anticorps ciblant spécifiquement les résidus thr69 et thr71 phosphorylés a permis de démontrer que ces deux sites sont phosphorylés en réponse à une limitation en acides aminés. L'analyse de cette double phosphorylation dans le contexte d'une cinétique de carence en leucine (30 minutes à 4 heures) montre que ces événements se produisent de manière concomitante pour les deux résidus.

### **5.4. La phosphorylation d'ATF2 nécessite l'activation du module MAPK : MEKK1>MKK7>JNK2,**

Concernant l'identification de la kinase d'ATF2, plusieurs expériences permettent de cibler JNK2. Premièrement, le traitement des cellules par des inhibiteurs spécifiques des kinases JNKs (SP600125 et JI8) inhibe la phosphorylation d'ATF2 en réponse à la carence en leucine. En revanche, cette phosphorylation est conservée dans les cellules traitées avec l'inhibiteur de ERK ou de p38. Deuxièmement, il est acquis que l'activité de JNK est induite par sa phosphorylation via les MAP2K. Or, on peut observer que la phosphorylation de JNK sur la thréonine 183 est augmentée dans les cellules carencées en leucine, supposant l'induction de son activité kinase. Enfin, afin de discriminer l'isoforme de JNK impliquée dans ce mécanisme, nous avons utilisé la technique des ARN interférences (siRNA). Ces expériences montrent clairement que le knock-down de JNK2 inhibe la phosphorylation d'ATF2 en réponse à la carence en acides aminés.

La technique des siRNA a aussi permis de déterminer les MAP2K et MAP3K impliquées dans la signalisation JNK2-dépendante et aboutissant à la phosphorylation d'ATF2. Ainsi le knock-down de MKK7 ou de MEKK1 inhibe la phosphorylation d'ATF2 et de JNK en réponse à la carence en acides aminés. La phosphorylation d'ATF2 en réponse à une carence en acides aminés nécessite donc la mise en jeu d'un module MAPK composé de MEKK1>MKK7>JNK2.

### **5.5. Le module MAPK est régulé en amont par deux GTPases : Rac1 et Cdc42, ainsi qu'une protéine G : Gα12**

Concernant les protéines régulant en amont le module MAPK, l'utilisation d'ARN interférences dirigés contre les GTPases : Rac1 et Cdc42 ainsi que la protéine Gα12 démontre l'implication de ces 3 protéines. Le rôle de Gα12 dans cette voie de signalisation est conforté par le fait que la transfection d'un allèle constitutif de cette protéine aboutit à une augmentation de la phosphorylation de JNK et d'ATF2.

Pris dans leur ensemble, ces résultats ont permis de conclure que la phosphorylation d'ATF2 requière au préalable l'activation d'une nouvelle voie de signalisation composée de Gα12>Rac1+Cdc42>MEKK1>MKK7>JNK2.

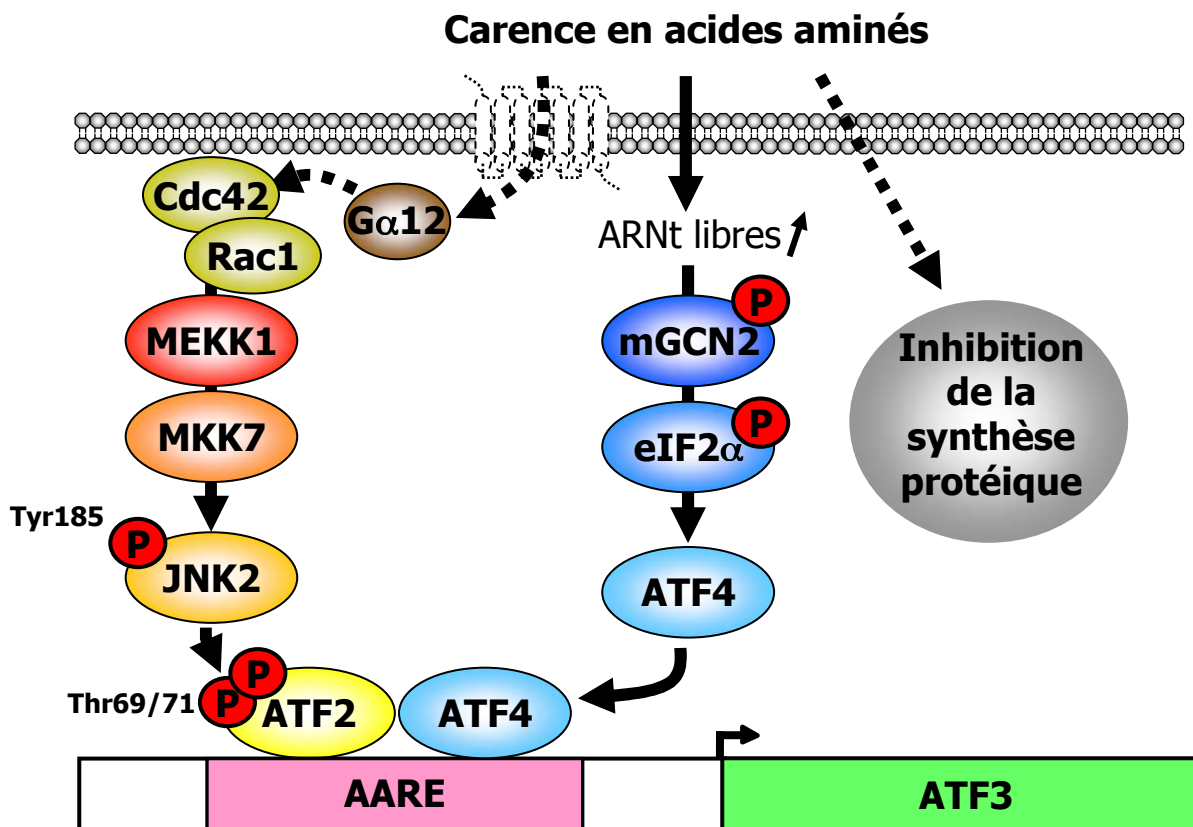
### **5.6. La voie Gα12/ATF2 contrôle l'expression d'ATF3 et CHOP en réponse à une carence en leucine**

La dernière partie de cette publication démontre l'importance de cette voie de signalisation sur la transcription AARE-dépendante des gènes *CHOP* et *ATF3*. Les knock-down de JNK2 (kinase terminale) ainsi que de Rac1+Cdc42 (GTPases en amont de la voie) affectent l'induction du messenger d'ATF3 ainsi que la transcription du gène luciférase sous le contrôle de l'AARE d'ATF3 lors d'une carence en acides aminés. Ce résultat n'est pas uniquement spécifique du gène *ATF3* puisque des résultats similaires ont été obtenus en utilisant l'AARE de *CHOP*. En revanche, la transcription d'un gène strictement ATF4-dépendant, comme *ASNS*, n'est pas modifiée dans de telles conditions.

# DISCUSSION & PERSPECTIVES

# DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Chez tous les êtres vivants, les acides aminés, au même titre que les autres nutriments, assurent de nombreuses fonctions et en particulier celle de modulateur de l'expression génique. Au niveau de la cellule procaryote ou eucaryote, une carence en acides aminés provoque l'activation de différentes voies de signalisation qui doivent conduire à la mise en place d'un programme moléculaire très précis impliqué dans la régulation transcriptionnelle de certains gènes spécifiques. Chez les mammifères, l'existence de ce type de régulation est maintenant clairement établie. Elle concerne un certain nombre de gènes, mais contrairement aux bactéries ou aux levures, une faible proportion sont directement impliqués dans le métabolisme protéique ou celui des acides aminés. Ces nutriments peuvent donc jouer un rôle plus large et réguler de nombreuses fonctions physiologiques. Lorsque ce travail de thèse a débuté, de nombreux travaux avaient permis de décrire les mécanismes moléculaires impliqués dans l'activation de la voie mGCN2/ATF4 au cours d'une carence en leucine ainsi qu'un certain nombre de fonctions physiologiques qu'elle régule. Il était également acquis que cette voie de signalisation n'était pas la seule à pouvoir être activée par une limitation en acides aminés. En effet, il avait été démontré l'existence d'une seconde voie aboutissant à la phosphorylation d'ATF2, facteur indispensable pour la régulation de la transcription d'un sous-groupe de gènes cibles. En revanche, les mécanismes moléculaires à l'origine de l'activation d'ATF2 lors d'une carence en acides aminés n'étaient pas identifiés. Les travaux présentés dans ce travail avaient donc pour but d'identifier de nouveaux mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation des gènes par une carence en acides aminés. Ainsi, nous avons pu déterminer une nouvelle voie de signalisation activée par ce stimulus et constituée des éléments  $G\alpha_{12}$ >Rac1+Cdc42>MEKK1>MKK7>JNK2>ATF2 (par la suite cette voie de signalisation sera désignée par l'acronyme :  $G\alpha_{12}$ /ATF2) (Figure 64). Nos résultats ont également pu apporter la preuve de l'implication de celle-ci sur la transcription AARE-dépendante du gène modèle *ATF3*. Dans ce chapitre, les résultats obtenus seront discutés et des expériences permettant de préciser les mécanismes moléculaires régulant l'activation de la voie  $G\alpha_{12}$ /ATF2 au cours d'une carence en acides aminés seront présentées. Egalement, quelques expériences permettant de relier ces résultats à la régulation de fonctions physiologiques seront proposées.



**Figure 64: Modèle de régulation de la transcription AARE-dépendante d'ATF3 par la carence en acides aminés chez les mammifères.** La carence en acides aminés provoque une inhibition de la synthèse protéique et l'accumulation d'ARNt libres au sein de la cellule. Cette dernière va induire la voie mGCN2/ATF4 et entraîner la fixation d'ATF4 à l'AARE d'ATF3. En parallèle, cette même carence va induire la voie de signalisation G12>Rac1+Cdc42>MEKK1>MKK7>JNK2 et induire la double phosphorylation d'ATF2. Ces deux voies de signalisation vont permettre l'induction du gène ATF3 en réponse à la carence en acides aminés (extrait de Chaveroux C. et al., 2009).

# **1. Caractérisation et rôle d'ATF2**

## **1.1 Sites de phosphorylation d'ATF2**

La littérature rapporte que l'activation d'ATF2 est régulée au niveau de la double phosphorylation de ses résidus thr69 et thr71, en particulier par les MAPKs. La mutation de l'un de ces sites abolit l'activité transactivatrice de ce facteur de transcription (Livingstone et al, 1995). Egalement, la sérine 90 est un autre site d'ATF2 décrit comme pouvant être phosphorylé par les MAPKs. En revanche, la fonction de cette phosphorylation reste à identifier (Morton et al, 2004). Nos résultats ont montré qu'ATF2 est phosphorylé sur ces deux premiers sites par l'intermédiaire de la voie Gα12/ATF2, en réponse à une carence en leucine. Si nos résultats sont clairs à propos de la phosphorylation de la thréonine 71 au cours d'une carence en leucine, plusieurs points restent à éclaircir, notamment en ce qui concerne la phosphorylation du résidu thréonine 69. Egalement, l'étude de la phosphorylation de la sérine 90 par JNK2 pourrait être envisagée.

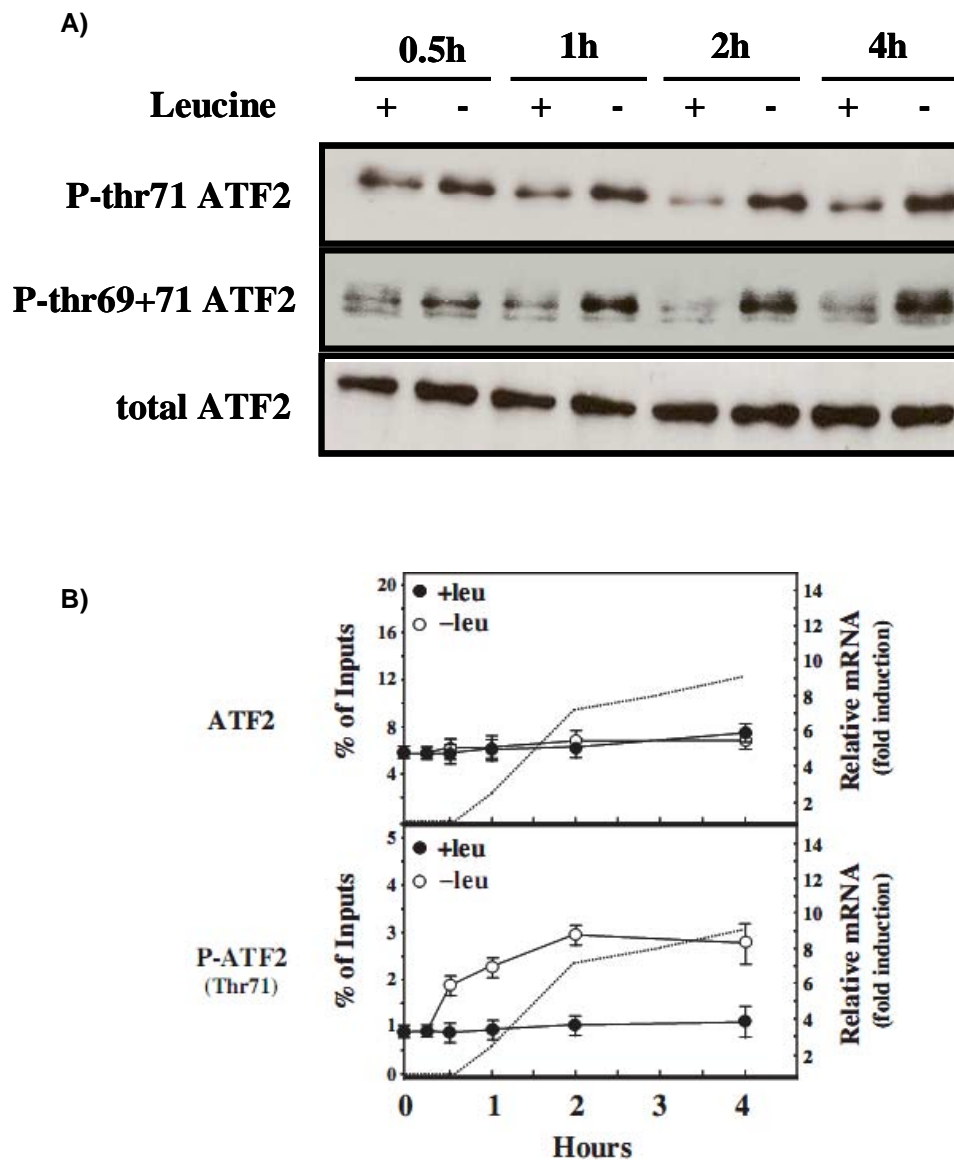
### **a) Phosphorylation des thréonines 69/71 d'ATF2 par JNK2**

Phosphorylation de la thréonine 69 par JNK2 : Les expériences menées avec les inhibiteurs spécifiques de JNK et les siRNA dirigés contre JNK2 montrent une inhibition de la phosphorylation d'ATF2 en réponse à la carence en leucine. Ces résultats ont été obtenus par western blot avec des anticorps reconnaissant soit phospho-thr71, soit la forme doublement phosphorylée d'ATF2 : phospho-thr69/71. Comme l'inhibition de JNK2 abolit la phosphorylation d'ATF2 sur le site thr71, les deux anticorps ne peuvent s'hybrider et nous ne pouvons donc pas conclure sur la régulation de la phosphorylation du site thr69. Nous n'avons pas trouvé de bons anticorps ne reconnaissant que la forme phosphorylée d'ATF2 sur le résidu 69. Un protocole expérimental consistant à transfecter des cellules ATF2<sup>-/-</sup> par un plasmide codant pour une forme mutée d'ATF2 sur le site thr71 peut être envisagé. Par la suite, ces cellules seront prétraitées avec l'inhibiteur de JNK (JI8) puis carencées en leucine et analysée par western blot avec un anticorps anti phospho-thréonines totales.

Séquence de phosphorylation d'ATF2 : Egalement, il serait intéressant de déterminer si l'induction de cette phosphorylation est séquentielle. En effet, le laboratoire de Van Dam H. (université de Leiden, Pays-Bas) a montré, dans un autre modèle que le notre, que la phosphorylation d'ATF2 était réalisée en deux étapes non simultanées et par deux kinases différentes. Ainsi, en réponse à l'insuline, la thréonine 71 est phosphorylée par ERK alors que

la thréonine 69 l'est par JNK ou p38 (Ouwens et al, 2002). Nous pourrions alors envisager que la phosphorylation d'ATF2 soit régulée de la même manière en réponse à la carence en leucine. Cependant, deux arguments appuient l'hypothèse, qu'en réponse à la carence en acides aminés, cet événement est uniquement régulé par JNK2 : i) entre 30 minutes et 4 heures de carence en leucine, en utilisant les mêmes anticorps et inhibiteurs que l'équipe de Van Dam H., nous n'observons pas de régulation séquentielle de cet événement. ii) le laboratoire de Van Dam H. a décrit ERK comme étant la kinase responsable de la phosphorylation du résidu thr71 en réponse à l'insuline. Nos résultats montrent que JNK2 est responsable de cette phosphorylation dans le cadre d'une carence en leucine.

Cinétique de phosphorylation d'ATF2 : Malgré cela, ces mêmes travaux montrent que la phosphorylation séquentielle d'ATF2 en réponse à l'insuline intervient très rapidement, dans une fenêtre d'activation entre 5 et 15 minutes de traitement. Nous ne pouvons donc pas exclure qu'il en soit de même dans le modèle de carence en leucine. Nous n'avons pu mesurer la phosphorylation d'ATF2 par western blot, uniquement dans des temps de carence en acides aminés supérieurs ou égaux à 30 minutes. L'analyse de cet événement dans des temps inférieurs est très difficile pour des raisons techniques. En effet, la privation en leucine nécessite un changement du milieu d'entretien pour un milieu carencé. Ceci provoque une augmentation du niveau basal de la phosphorylation d'ATF2 total, observable dans les temps précoces de limitation en leucine (30 minutes-1 heure) (Figure 65). Ce phénomène peut s'expliquer par l'afflux de facteurs de croissances engendré par le changement de milieu et pouvant activer les MAPKs et par la même, la phosphorylation d'ATF2. Il est donc difficile de discriminer la part d'induction de la phosphorylation d'ATF2 propre à la carence en leucine de celle provoquée par le changement de milieu. Il faut cependant nuancer l'impact de cet événement, qui ne semble pas affecter la forme d'ATF2 liée à l'AARE. En effet, si le changement de milieu provoque bien une induction de la phosphorylation d'ATF2 totale visible par western blot, celle-ci n'est pas observée lors d'expériences de ChIP dirigées seulement contre phospho-thr71 d'ATF2 au niveau de l'AARE de *CHOP* ou *ATF3*. C'est pourquoi, afin de préciser la séquence de phosphorylation d'ATF2 en réponse à la carence en leucine et pour des temps inférieurs à 30 minutes, la technique de ChIP avec les deux anticorps : anti phospho-thr71 et phospho-thr69+71 peut être une bonne alternative au western blot.



**Figure 65: Le changement de milieu au cours d'une carence en leucine induit la phosphorylation d'ATF2 total mais n'affecte pas la partie d'ATF2 liée à l'AARE. A)** Expériences de western blot : le changement de milieu nécessaire pour réaliser les carences en leucine induit une double phosphorylation d'ATF2 total, particulièrement dans les temps précoces de limitation (30 minutes-1 heure). **B)** Expériences de ChIP : Cette induction ne se traduit pas par une augmentation de la phosphorylation d'ATF2 liée à l'AARE de *CHOP* (extraits de Chaveroux C. *et al.*, 2009 et Bruhat A. *et al.*, 2007).



### **b) Phosphorylation de la sérine 90 d'ATF2 en réponse à la carence en acides aminés**

Un troisième site d'ATF2, la sérine 90, est connu pour pouvoir être phosphorylé en réponse à l'anisomycine ou le TNF $\alpha$ . La littérature ne rapporte pas de fonction régulatrice connue pour cette modification d'ATF2, et elle n'est pas associée à la hausse de l'activité transcriptionnelle de ce facteur. En revanche, les travaux de Morton *et al.* démontrent que la phosphorylation de ce résidu est spécifique de la kinase JNK (Morton et al, 2004). Comme nos résultats indiquent que JNK2 est la kinase d'ATF2 sur les thréonines 69 et 71 en réponse à la carence en acides aminés, on ne peut donc pas exclure que ce site soit également phosphorylé dans le même contexte et joue un rôle annexe dans la réponse cellulaire à ce stimulus. Une analyse par western blot de cette modification spécifique d'ATF2 permettrait de vérifier cette hypothèse.

### **1.2. Rôle de la phosphorylation d'ATF2 sur la transcription AARE-dépendante**

Si la caractérisation de la phosphorylation est un point important pour préciser le rôle d'ATF2 dans la réponse à la carence en acides aminés, il apparaît aussi nécessaire de déterminer la fonction propre de cette phosphorylation dans l'activation de la transcription dépendante de l'AARE.

Pour rappel, ATF2 est un facteur de transcription constitutivement fixé à l'AARE de *CHOP* ou *ATF3*, et indispensable pour l'induction de certains gènes en réponse à la carence en acides aminés (Bruhat et al, 2007). Au cours de cette stimulation, il est phosphorylé sur ses deux résidus transactivateurs (thréonines 69/71) (Chaveroux et al, 2009). Cette phosphorylation est un phénomène extrêmement rapide, puisqu'elle intervient dès 15 minutes au niveau de l'AARE (en tout cas pour le résidu thr71), contre 1 heure pour la fixation d'ATF4 (Bruhat et al, 2007; Cherasse et al, 2007). Egalement, ATF2 contrôle l'état chromatinien par le recrutement d'activités HATs ainsi que la libération de cofacteurs (HDAC, JDP2) au niveau de l'AARE au cours d'une carence en leucine (Bruhat et al, 2007) (Cherasse et al, 2008). Il faut préciser que tous ces travaux ont été obtenus dans un contexte cellulaire invalidé totalement pour l'expression de la protéine ATF2 et sont d'ailleurs à la base de la classification des gènes cibles de la limitation en acides aminés en fonction de leurs dépendances à ATF2. Dans ce modèle, on peut donc supposer que la phosphorylation d'ATF2 peut avoir deux fonctions : i) celle d'activatrice de l'activité transcriptionnelle d'ATF2 et

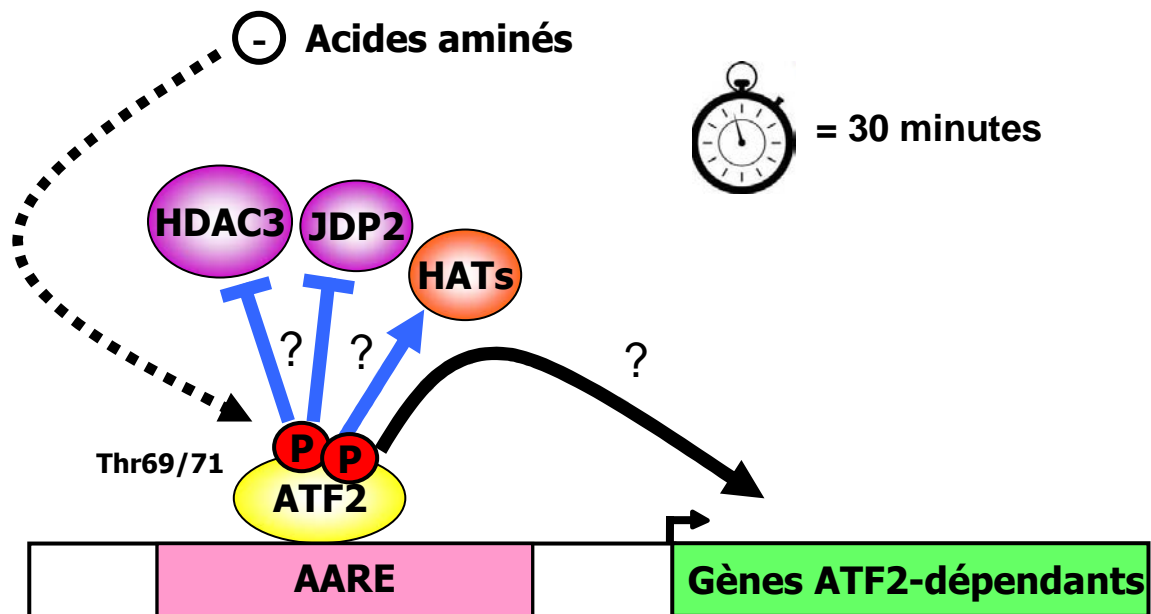
donc de l'expression des gènes cibles, ii) celle d'intermédiaire pour le recrutement de cofacteurs (HATs) impliqués dans la conformation chromatinienne de l'AARE (Figure 66).

Activité transactivatrice de la phosphorylation d'ATF2 : La littérature rapporte que l'activité transcriptionnelle de ce facteur est uniquement régulée par phosphorylation des résidus thr69 et 71. Les expériences effectuées dans un contexte cellulaire invalidé pour ATF2 ont montré que les gènes *CHOP* et *ATF3* n'étaient plus induits en réponse à la carence en acides aminés. Egalement, des expériences ont été réalisées au laboratoire par transfections de cellules HeLa avec un dominant négatif d'ATF2 (non phosphorylable sur les thr69/71 et ser90) suivies de carence en leucine. Ces expériences montrent que les cellules transfectées avec ce mutant perdent l'inductibilité d'un gène rapporteur (luciférase) sous la régulation de deux AARE de *CHOP*. Cependant, il est toujours difficile de conclure sur ce type d'expériences car des effets de titrage des facteurs de transcription par la surexpression d'ATF2 sauvage ou muté peuvent avoir lieu.

Les résultats présentés dans la publication montrent que le knock-down de JNK2, abolissant la phosphorylation d'ATF2, n'inhibe que de 30% l'expression d'ATF3 en réponse à une carence en leucine. Ce résultat suggère donc que soit la phosphorylation d'ATF2 n'est pas totalement éteinte dans les cellules transfectées avec le siRNA contre JNK2, soit la phosphorylation d'ATF2 n'est donc pas essentielle pour l'induction des gènes cibles au cours d'une carence en leucine.

Rôle de la phosphorylation d'ATF2 dans le recrutement de l'activité HAT : Nos résultats ne permettent pas de déterminer si la phosphorylation d'ATF2 joue également un rôle dans le recrutement de l'activité HAT au niveau de l'AARE de *CHOP* ou d'*ATF3* en réponse à une carence en leucine. Des expériences de ChIP dirigées contre la forme acétylée de l'histone H4, dans des cellules transfectées avec le siRNA spécifique de JNK2, permettraient de déterminer si cette phosphorylation est impliquée dans la mobilisation des cofacteurs au cours d'une carence en leucine.

En l'état actuel, nous ne pouvons pas discriminer entre le rôle de la phosphorylation d'ATF2 dans l'activation directe de la transcription et/ou le recrutement des cofacteurs. Afin de conclure définitivement sur cette question, le laboratoire a entamé la démarche pour se procurer les cellules ATF2 A/A. Cette lignée, développée dans le laboratoire de Nic Jones à Manchester, est issue de souris "knock-in" sur les résidus thr51 et thr53 (équivalents à thr69 et thr71 chez l'homme). Ces sites ont été remplacés par deux alanines, empêchant la phosphorylation activatrice d'ATF2. Il faut préciser que ces souris présentent exactement les mêmes phénotypes que les souris invalidées pour ATF2, indiquant que ces sites sont bien



**Figure 66: Fonctions potentielles de la phosphorylation d'ATF2 dans la phase précoce de la réponse à la carence en acides aminés.** La phosphorylation d'ATF2 intervient dès 15 à 30 minutes en réponse à la carence en acides aminés. Elle peut potentiellement réguler l'expression des gènes ATF2-dépendants à deux niveaux : i) directement sur le gène cible par l'intermédiaire de son activité transactivatrice (flèche noire). ii) En régulant le recrutement de cofacteurs comme les HATs ou le relargage de HDAC3/JDP2 (flèches bleues)

indispensables pour la fonction biologique de ce facteur. Les cellules dérivées de ces souris sont donc un choix judicieux pour vérifier la dépendance des gènes cibles de la carence en leucine vis-à-vis d'ATF2 et pouvoir comparer ces résultats avec ceux déjà obtenus dans les cellules ATF2<sup>-/-</sup>. Ce modèle cellulaire pourrait faire également l'objet d'études transcriptomiques permettant d'isoler de nouveaux gènes modèles dépendants de la phosphorylation d'ATF2 afin de bien dissocier le rôle de ce facteur et de sa voie signalisation par rapport à celui de la voie mGCN2/ATF4 dans la réponse à une limitation en acides aminés.

### **1.3. Rôle des phosphatases d'ATF2**

Dans la littérature, aucune phosphatase n'a encore été identifiée comme étant capable de déphosphoryler la protéine ATF2. La régulation négative de l'activité de ce facteur a été uniquement démontrée par sa dégradation protéasome-dépendante (Bhoumik et al, 2007). Néanmoins, nous ne pouvons pas exclure un rôle de phosphatases ciblant ATF2 dans notre modèle d'étude. Pour les identifier, seule une approche globale par banque de siRNA ou shRNA dirigés contre les phosphatases est possible. Ce type de matériel permet de cibler plus de 260 gènes codant chacun pour une protéine décrite dans la littérature comme ayant une activité phosphatase. La transfection de ce type de banque permettrait de déterminer rapidement et efficacement les protéines responsables de la déphosphorylation d'ATF2 et des kinases en amont au cours d'une carence en leucine. En revanche, ce type d'approche est conditionnée par la mise au point d'un crible permettant de mesurer rapidement et facilement l'activité d'ATF2. Or les gènes modèles strictement dépendants de la phosphorylation d'ATF2 ne sont pas encore identifiés. Le seul crible disponible aujourd'hui est l'étude de la phosphorylation de ce facteur en réponse à une carence en acides aminés, et ne permet donc pas une analyse simple des données. Ainsi, en l'état actuel des connaissances, nous ne pouvons donc pas faire de ce projet une priorité.

## **2. Régulation du module MAPK en réponse à une carence en acides aminés**

### **2.1. Rôle de JNK1**

Les résultats présentés dans la publication ont permis de démontrer que JNK2 est la kinase responsable de la phosphorylation d'ATF2 en réponse à une carence en leucine. Toutefois,

nos résultats montrent également que les transfections avec le siRNA dirigé contre JNK1 affectent légèrement cette phosphorylation en réponse à une carence en leucine. On peut tout de même émettre l'hypothèse que cette kinase puisse également jouer un rôle secondaire. Toutefois, dans les études fonctionnelles présentées dans la partie Résultat, le "knock-down" de JNK2 est le seul (comparé à celui de JNK1) à affecter la transcription AARE-dépendante d'*ATF3* ou de *CHOP*. Ces résultats indiquent bien que seule l'isoforme JNK2 joue un rôle dans la réponse à la carence en acides aminés.

## **2.2. Activation de JNK2**

L'activation de cette famille des kinases JNK est induite par leur double phosphorylation obligatoire sur les résidus thr183 et tyr185 par les MAP2K : MKK4 ou MKK7 (Raman et al, 2007). Nos travaux ont notamment démontré que MKK7 était responsable de l'activation de JNK2 et que la cinétique de phosphorylation de cette MAPK corrélait parfaitement avec celle d'*ATF2* en réponse à une carence en leucine. Toutefois, l'anticorps utilisé pour cette expérience ne reconnaît que le résidu phospho-tyr185. On peut donc s'interroger sur l'état de phosphorylation du résidu thr183 en réponse à la limitation en leucine. D'autant plus, Lawler *et al.* (Lawler et al, 1998) ainsi que Tournier *et al.* (Tournier et al, 2001) ont montré que MKK7 phosphoryle plus favorablement les résidus thréonines alors que MKK4 aurait une affinité plus forte pour les résidus tyrosines. L'activation maximale de JNK2 pourrait donc être due à une coopération entre ces MAP2K au cours d'une carence en leucine. Toutefois, plusieurs arguments vont en faveur d'un rôle spécifique de MKK7 dans l'activation de JNK2 : i) il a été montré que MKK7, seule, peut activer JNK (Foltz et al, 1998) ii) dans notre modèle, le "knock-down" de MKK7, uniquement, abolit complètement la phosphorylation d'*ATF2* et de JNK. Cependant, l'utilisation d'un anticorps spécifique de la forme phosphorylée de la thréonine 183 permettrait de répondre à cette question.

## **2.3. Protéines régulatrices du module MAPK**

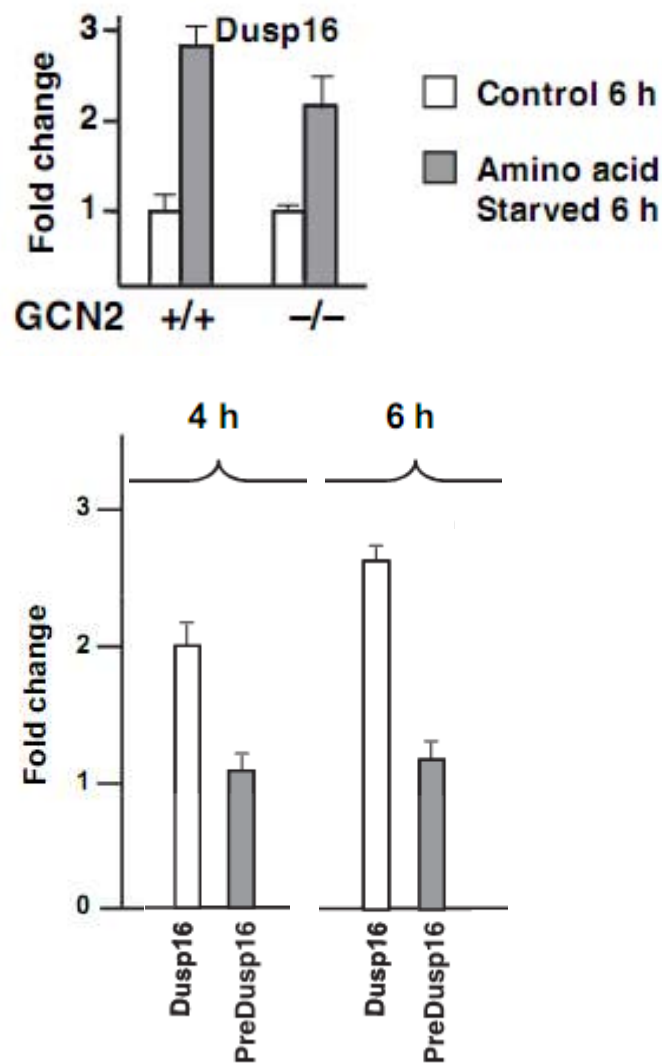
### **a) Régulation du module par les phosphatases**

La voie de signalisation aboutissant à la phosphorylation d'*ATF2* requière l'activation de plusieurs intermédiaires par cascade de phosphorylation. L'un des éléments de cette cascade est le module MAPK constitué de MEKK1>MKK7>JNK2. Selon la littérature, ce type de module est régulé par l'action de phosphatases. L'expression de ces protéines est souvent induite par le même stimulus activant la kinase correspondante afin de mettre en place un

rétrocontrôle négatif. Nous n'avons pas entrepris de travaux sur l'identification des phosphatases mises en jeu pour réguler le module MAPK au cours d'une carence en leucine. Cependant, les analyses transcriptomiques déjà réalisées au laboratoire peuvent indiquer des pistes de recherche. Parmi les gènes induits par la carence en leucine, nous avons mis en évidence l'augmentation de l'expression du gène DUSP16 (Figure 67) (Deval et al, 2009). Cette induction, observée dans les profils de messagers issus de cellules ATF4 +/+ et -/-, est le résultat de l'augmentation de la stabilité du messager. Or DUSP16 (aussi appelée MKP7) est une phosphatase connue pour réguler la déphosphorylation des SAPKs voire spécifiquement celle de JNK (Teng et al, 2007) Il serait intéressant d'étudier le rôle de cette phosphatase sur la régulation du module MAPK dans le cadre d'une carence en leucine. Des études de "phosphatase assays" et de surexpression ou d'inactivation de DUSP16 dans un contexte de carence en leucine sont donc envisagées.

#### **b) Régulation du module par les protéines adaptatrices**

Le module MAPK nécessite la mise en place de protéines d'échafaudage afin de faciliter la cascade de phosphorylation. Ces protéines sont donc également des régulateurs essentiels de la transmission du signal. Nous n'avons pas encore entrepris de travaux permettant l'identification de ces protéines. De plus, le niveau d'expression de celles-ci n'est pas régulé au niveau transcriptionnel (Dard & Peter, 2006). Nous devons donc envisager une approche ciblée pour identifier les protéines susceptibles de jouer ce rôle dans le module MEKK1>MKK7>JNK2 en réponse à la carence en leucine. Parmi les protéines candidates, nous pouvons citer les JIPs ou la  $\beta$ -arrestin 2, spécifiques des kinases JNKs. Nous pouvons donc examiner l'impact de l'inactivation spécifique de chacune d'entre elles sur la phosphorylation d'ATF2 en réponse à une carence en acides aminés. De plus, la régulation des protéines d'échafaudage se fait par l'intermédiaire de phénomènes de phosphorylations, ubiquitinations, oligomérisations ou translocation nucléaire (Dard & Peter, 2006). Une étude des modifications post-traductionnelle de la protéine d'échafaudage d'intérêt peut également être considérée.



**Figure 67: Analyse de l'expression de la phosphatase DUSP16 au cours d'une carence en acides aminés.** A) Une carence en leucine de 6 heures provoque l'augmentation de l'expression de la phosphatase DUSP16. Cette induction est mGCN2-indépendante B) Si la quantité d'ARNm mature de DUSP16 augmente en réponse à une carence en leucine de 4 et 6 heures, celle des pré-ARNm ne varie pas. Ceci suggère que cette réponse est essentiellement due à une stabilisation du messager de cette phosphatase au cours de la privation en acides aminés (extrait de Deval C. et al., 2009).

### **3. Eléments activateurs du module MAPK au cours d'une carence en acides aminés**

#### **3.1. Rôles des GTPases Rac1 et Cdc42**

Le module MAPK impliqué dans la phosphorylation d'ATF2 est contrôlé par deux GTPases Rac1 et Cdc42. Nos résultats suggèrent des fonctions redondantes de ces deux GTPases dans l'activation de la voie  $G\alpha_{12}$ /ATF2. Cet aspect a déjà été décrit dans de nombreuses publications traitant de leurs rôles dans l'activation plaquettaire, la régulation de la formation du cytosquelette et du trafic vésiculaire (Frank et al, 2006; Kurokawa et al, 2004).

Ces deux protéines ont été particulièrement étudiées pour leurs rôles dans la régulation de la réorganisation du cytosquelette (pour revue (Heasman & Ridley, 2008)). Ces données de la littérature peuvent être mises en regard avec nos précédentes analyses transcriptomiques. Celles-ci ont mis en évidence que de nombreux gènes induits par la carence en acides et impliqués dans la réorganisation du cytosquelette. Parmi ceux-ci, la zyxin a déjà été décrite comme pouvant être régulée par Rac1 et Cdc42 (Castellano et al, 1999; Tufvesson & Westergren-Thorsson, 2003). Toutefois, ces données de puces à ADN doivent être confirmées par analyses de qPCR. Par la suite, des mesures de l'expression de la zyxin, et d'autres gènes, pourraient être envisagées dans les cellules knock-down pour Rac1 et Cdc42, carencée ou non en leucine.

De plus, il est clairement démontré dans la littérature qu'une carence en acides aminés provoque la mise en place de mécanismes autophagiques afin de palier à la privation de ce type de nutriments (pour revue (Chang et al, 2009)). Or, récemment, l'équipe de SJ. Lee a montré que la voie Rac1/MKK7/JNK, trois intermédiaires communs à la voie  $G\alpha_{12}$ /ATF2, était nécessaire pour la mise en place de l'autophagie induite par l'oncogène V-Ras. Dans ce même contexte, ce groupe démontre que cette voie permet l'induction de l'expression de Atg5, protéine impliquée dans la formation de vacuoles autophagiques (Byun et al, 2009). On peut alors émettre l'hypothèse que, en réponse à la carence en acides aminés, l'activation de cette même voie participe à l'instauration de ces phénomènes autophagiques afin de compenser la carence en acide aminés.

Afin de vérifier cela, nous envisageons d'évaluer l'induction des gènes marqueurs de la mise en place des mécanismes d'autophagie comme Atg5, dans les cellules knock-down pour Rac1.



## **3.2. Identification des partenaires de Gα12**

### **a) Sous-unités Gβ et Gγ**

Le dernier élément régulateur identifié de cette nouvelle voie est Gα12. Cette protéine fait partie de la famille des protéines GTPases liées à la surface interne de la membrane cellulaire et forme un hétérotrimère avec deux autres sous-unités Gβ et Gγ. A l'état basal, les protéines Gα sont constitutivement fixées à une molécule de GDP. Dans ce cas, le dimère Gβγ inhibe la libération spontanée de GDP. On parle alors d'activité GDI (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor) de Gβγ vis-à-vis de Gα. Les protéines Gβ et Gγ sont donc des régulateurs importants de la transduction du signal. Dans notre modèle de carence en leucine, il est donc important de déterminer les isoformes de ces protéines et ainsi préciser notre schéma de régulation de la voie Gα12/ATF2 par la privation en acides aminés. Chez l'homme, cinq sous-unités Gβ et douze sous-unités Gγ ont été identifiées (Tableau 10) (Schwindinger & Robishaw, 2001). Parmi elles, certaines ont une expression tissulaire très restreintes (Gγ1, Gβ5) et ne sont donc pas de bons candidats pour notre étude. Egalement, plusieurs d'entre elles sont connues pour moduler l'activité de certaines MAPKs. Ainsi l'isoforme Gβ4 a été démontrée comme activateur de la voie PI3K/Raf-1/ERK1/2 en réponse au traitement à la dihydrotestostérone (DHT) (Zagar et al, 2004). Le dimère Gβ1γ2 est impliqué dans l'activation des SAPKs (p38 et JNK) en réponse aux UV et est essentiel pour l'induction transcriptionnelle de *CHOP* et *c-Jun* au cours de ce même stimulus (Seo et al, 2002). Des expériences d'inactivation ou de surexpression de ces protéines G pourraient être réalisées dans un contexte de carence en leucine afin de vérifier si elles jouent un rôle dans l'induction de la voie Gα12/ATF2.

### **b) Guanine exchange Factors (GEFs)**

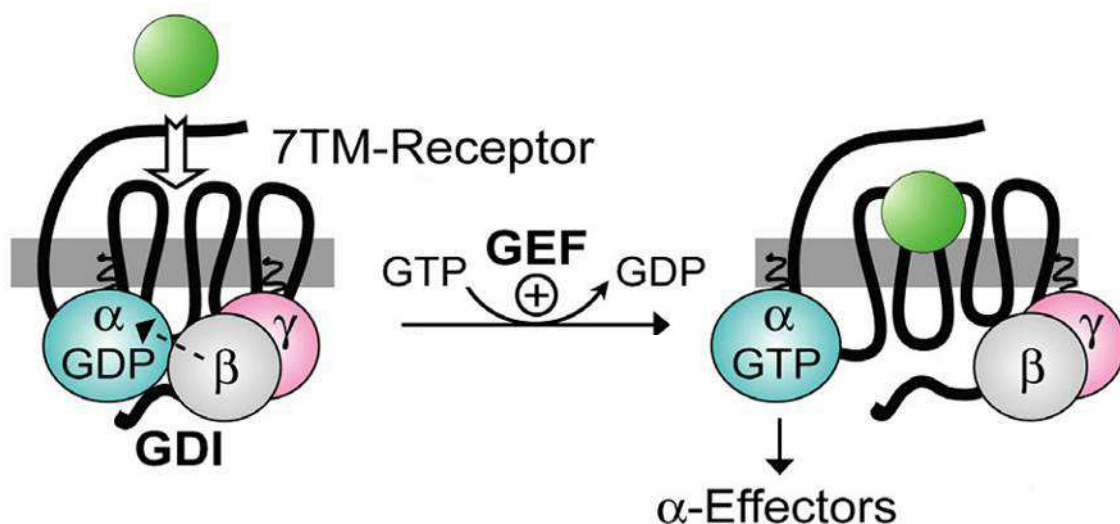
Les Guanine Exchange Factors (GEFs) sont une autre classe de protéines régulatrices des sous-unités Gα. A l'état basal, Gα, sous sa forme inactive, est couplée à une molécule de GDP. Lors de l'activation d'un récepteur couplé aux protéines G, celui-ci adopte un changement de conformation facilitant l'échange du GDP par un GTP (Figure 68). Ceci provoque alors la dissociation du trimère Gαβγ. Le chargement de Gα par du GTP est assuré par les protéines GEFs et va permettre la phosphorylation de GTPases en aval (Sikorski & Buratowski, 2009).

Dans le cas d'une carence en leucine, nous avons montré que la protéine Gα12 induisait la voie de signalisation via les GTPases Cdc42+Rac1. Afin d'activer ces deux protéines, Gα12

Gene name	Protein name (s)	Unigene or Genbank	Cytogenetic position	cDNA Sources (UniGene ESTs)
GNB1	$\beta_1$	Hs.215595	1p36.21 – 36.33	WIDE + Adipose, adrenal gland, cervix, esophagus, eye, liver, small intestine, stomach, thymus, thyroid
GNB2	$\beta_2$	Hs.273457	7q21.3 – q22.1	(WIDE – Aorta, Bone, Skin) + adrenal gland, esophagus, larynx, stomach, synovial membrane, thymus
GNB3	$\beta_3$	Hs.71642	12p13	Brain, colon, eye, germ cell, heart, lung, pancreas
(GNB4)	$\beta_4$	Hs.172654	3q26 – q27	Brain, breast, heart, kidney, liver, lung, lymph, muscle, ovary, pancreas, placenta, uterus
GNB5	$\beta_5$	Hs.275353	15q21	Brain, eye, germ cell, lung, lymph, ovary
GNGT1	$\gamma_{11}, \gamma_{mod}$	Hs.73112	7q21.3	Brain, eye
GNGT2	$\gamma_{14}, \gamma_{common}, \gamma_8$	Hs.181781	17q21	Eye, colon, heart, kidney, lung, lymph, skin, tonsil, uterus
GNG2	$\gamma_2, \gamma_6$	Hs.23767	14q21	(WIDE – Parathyroid) + Adrenal gland, cervix, ear, eye, liver, stomach, tongue
GNG3	$\gamma_3$	Hs.179915	11p11	Blood, brain, germ cell
GNG4	$\gamma_4$	Hs.32976	1	Brain, breast, colon, germ cell, kidney, lung, prostate
GNG5	$\gamma_5$	Hs.5322	1p22	(WIDE – Germ Cell) + adipose, ear, esophagus, skin
GNG7	$\gamma_7$	Hs.127828	19p13.3	Brain, colon, eye, germ cell, kidney, lung, thymus, testis
(GNG8)	$\gamma_8, \gamma_9$	AF188179	19q13.2 – q13.3	
GNG10	$\gamma_{10}$	Hs.79126	9q31 – q32	(WIDE – Blood, Muscle) + Bladder, stomach, thyroid
GNG11	$\gamma_{11}$	Hs.83381	7q21.3	Aorta, brain, esophagus, foreskin, heart, kidney, lung, ovary, pancreas, placenta, prostate, spleen, stomach, testis, thymus, uterus
(GNG12)	$\gamma_{12}$	AF188181	1p31 – p33	
(GNG13)	$\gamma_{13}$	AL031033	16p13.3	

(WIDE = Aorta, Blood, Bone, Brain, Breast, Colon, Foreskin, Germ Cell, Heart, Kidney, Lung, Lymph, Muscle, Ovary, Pancreas, Parathyroid, Placenta, Prostate, Skin, Testis, Tonsil, and Uterus). Gene names in parentheses are not official

**Tableau 10: Protéines G $\beta$  et G $\gamma$  et leurs localisations tissulaires chez l'homme.** Chez l'homme, seulement 5 protéines G $\beta$  et 12 G $\gamma$  ont été identifiées. Ces protéines ont également des répartitions tissulaires différentes (d'après Schwindinger W.F. et Robishaw J.D., 2001).



**Figure 68: Rôle des Guanine Exchange Factors (GEFs) dans la régulation de l'activité de la sous-unité G $\alpha$ .** Lors de l'activation d'un RCPCG, le changement de conformation du récepteur induit l'échange de GDP pour du GTP au niveau de la sous-unité G $\alpha$ . Cette étape est assurée par les GEFs. La terminaison du signal se fait par l'intermédiaire des GAPs, chargées d'hydrolyser le GTP. 7TM-Receptor : Récepteurs à 7 domaines transmembranaires (d'après Siderovski D.P. et Willard F.S., 2005).

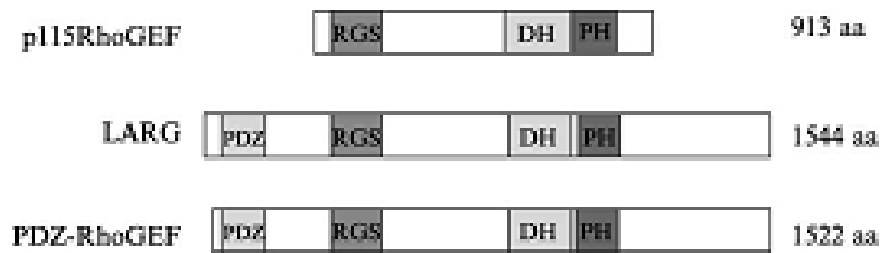
doit être rechargée en GTP par l'intermédiaire d'un GEF. La famille des RhoGEF a été la plus étudiée. Trois protéines de cette famille sont connues pour interagir avec  $G\alpha_{12}$  et/ou  $G\alpha_{13}$  : p115RhoGEF, PDZ-RhoGEF et LARG et réguler positivement leurs activités. Ces 3 facteurs ont la particularité d'avoir un domaine spécifique RGS (Regulator of G-protein Signaling) leur permettant d'interagir directement avec  $G\alpha_{12/13}$  (Figure 69) (Bhattacharyya et al, 2009) (Tanabe et al, 2004). De plus, les protéines LARG et PDZ-RhoGEF semblent plus impliquées dans la régulation de l'activité de  $G\alpha_{12}$  (Sternweis et al, 2007). On peut envisager d'invalider spécifiquement chacune de ces protéines et regarder l'impact de ce traitement sur la phosphorylation de JNK2 et d'ATF2.

Bien que ces différentes protéines soient des régulateurs potentiels importants de la voie  $G\alpha_{12}$ /ATF2, nous avons fait une priorité d'identifier le récepteur membranaire en amont de cette protéine G. La méthodologie envisagée est décrite dans la partie suivante.

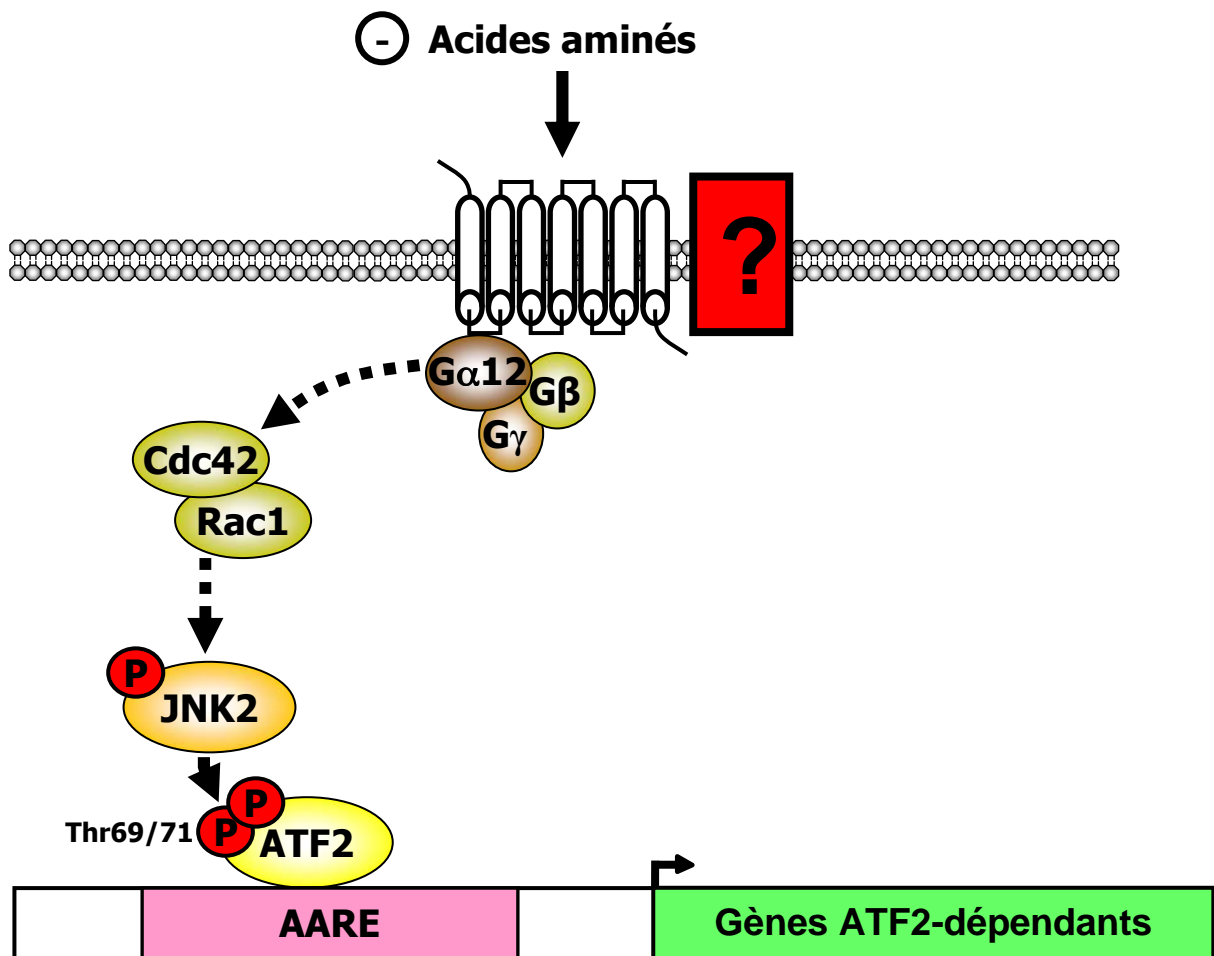
### **3.3. Identification du récepteur membranaire**

Le récepteur à l'origine de cette voie de signalisation reste à déterminer et est une priorité de recherche au sein du laboratoire. Le fait que  $G\alpha_{12}$  soit impliquée dans cette voie nous oriente sur un récepteur couplé aux protéines G (RCPG), la principale difficulté de ce travail est de trouver le récepteur d'intérêt dans la plus grande famille de protéines membranaires (Figure 70). En effet, on considère actuellement que le génome humain comporte 853 gènes codant chacun pour un RCPG. Parmi eux, 478 codent pour un récepteur impliqué dans la "chémosensation" (récepteur olfactif ou du goût) et 375 peuvent avoir de multiple ligands comme les amines biogéniques (ex : histamine), acides aminés, peptides, nucléotides ou lipides. Nombre d'entre eux (environ 120) n'ont pas de ligand connu et sont donc qualifiés "d'orphelins" (Oh et al, 2006). A cela, s'ajoute un second degré de complexité au niveau de la fonctionnalité de ces récepteurs. En effet, 60 RCPG sont décrits comme ayant une activité constitutive (indépendamment de la fixation d'un ligand) (Seifert & Wenzel-Seifert, 2002). Enfin, il est désormais acquis qu'un RCPG n'agit pas en tant que monomère. Cette famille de récepteur peut s'associer avec d'autres membres des RCPG et/ou d'autres classes de protéines pour former un dimère voire un oligomère et activer de multiples voies de signalisation (Chung et al, 2008; Iismaa et al, 2006). Ceci suppose que plusieurs récepteurs pourraient être impliqués dans la réponse à la carence en acides aminés.

Notre seul crible pourrait être de sélectionner les récepteurs connus pour être couplés à la protéine  $G\alpha_{12}$ . Tout d'abord, pour beaucoup de RCPG, la protéine  $G\alpha$  qui leur est associée n'est pas encore déterminée. De plus, un même récepteur peut recruter différentes protéines



**Figure 69: Structures protéiques des RhoGEFs : p115-RhoGEF, LARG et PDZ-RhoGEF.** Ces 3 protéines possèdent entre autres un domaine commun : le domaine RGS qui leurs permettent d'interagir spécifiquement avec les protéines  $G\alpha_{12/13}$ . Le domaine DH (Dbl Homology) permet de lier le GTP et les GTPases de la famille des Rho (par exemple : Cdc42 ou Rac1) alors que le domaine PH (Pleckstrin Homology domain) permet la localisation cellulaire du GEF. Le segment PDZ uniquement présent pour LARG et PDZ-RhoGEF serait impliqué dans la liaison entre le GEF et les récepteurs couplé aux protéines G (extrait de Tanabe et al., 2004).



**Figure 70: Identification du récepteur couplé à la protéine  $G\alpha_{12}$  et activé au cours d'une carence en leucine.**

type de  $G\alpha$  en fonction du ligand et du type cellulaire dans lequel il est activé (Dalrymple et al, 2008; Tobin et al, 2008). Il est difficile d'envisager une approche ciblée d'invalidation génique, seule une approche globale pourra être pertinente, notamment par l'intermédiaire d'une banque dirigée contre les RCPG. Comme expliqué en partie 1.1.3, ce type d'approche nécessite le développement d'un crible permettant de mesurer facilement l'activité d'ATF2 et qui n'est pas encore disponible.

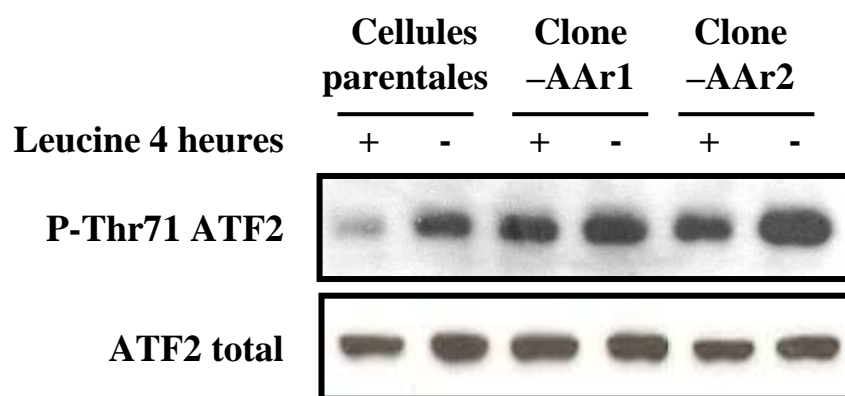
Au laboratoire, nous avons fait le choix d'une alternative à cette technique, en développant des outils cellulaires par génétique fonctionnelle. Ainsi, nous avons sélectionné des cellules capables de se développer dans un milieu très appauvri en acides aminés. Les premières analyses réalisées sur les clones sélectionnés (clones -AAR) ont montré une phosphorylation basale d'ATF2 plus forte que dans les cellules parentales (Figure 71). De plus, ces cellules conservent leurs capacités de réponse à la carence totale en leucine. Les analyses transcriptomiques réalisées sur ces cellules -AAR ont permis d'identifier plusieurs RCPG surexprimés à l'état basal. Il est prévu de réaliser une invalidation spécifique par siRNA de chacun d'entre eux afin de vérifier si la phosphorylation d'ATF2 est affectée en réponse à une carence en leucine. Par la suite, des expériences de surexpression du RCPG d'intérêt ou d'invalidation du gène seront à envisager.

## **4. Autres cibles et rôle de la voie $G\alpha_{12}$ /ATF2 dans la régulation des fonctions physiologiques**

Après avoir identifié cette nouvelle voie de signalisation, il est nécessaire de la valider *in vivo* mais également de pouvoir déterminer les fonctions physiologiques qu'elle régule. Du fait de la complexité des voies MAPK, mais également des protéines en amont, la signalisation initiée par  $G\alpha_{12}$  peut contrôler de nombreuses autres cibles (autre qu'ATF2). L'identification de celles-ci ainsi que les fonctions physiologiques qu'elles régulent en réponse à l'activation du récepteur couplé à  $G\alpha_{12}$  par une carence en acides aminés est également une priorité du laboratoire. Nous avons proposé plusieurs expériences afin de répondre à ces questions.

### **4.1. Activité de la voie $G\alpha_{12}$ /ATF2 *in vivo***

Si la confirmation de l'activation et du rôle physiologique de la voie mGCN2/ATF4 a été déjà démontré *in vivo*, aucune donnée n'est encore disponible concernant le rôle de la voie  $G\alpha_{12}$ /ATF2. Il est donc important de valider les résultats présentés dans la publication sur un modèle animal. Une expérience chez la souris consisterait à induire cette voie par un régime



**Figure 71: Analyse de la phosphorylation d'ATF2 dans des clones cellulaires résistants à un milieu appauvri en acides aminés (-AAr).** Les cellules -AAr1 et 2 présentent une phosphorylation constitutive d'ATF2 comparativement aux cellules parentales. En revanche, elles conservent leurs capacités à sur-induire cette phosphorylation en réponse à une carence totale en leucine de 4 heures.

carence en leucine (utilisé en routine au laboratoire). Les phosphorylations de JNK2 et d'ATF2 pourront être étudiées par western blot sur les organes cibles (foie, cerveau). Néanmoins, la prise d'un repas déclenche une libération d'hormones (et en particulier l'insuline) pouvant également induire la phosphorylation d'ATF2 et pourrait interférer avec celle induite spécifiquement par la carence en leucine. Dans ce cas, nous pouvons également prévoir de focaliser notre étude au niveau de l'AARE de *CHOP* et *ATF3* par la technique de ChIP dirigée contre phospho-ATF2.

En revanche, la validation *in vivo* de la voie  $G\alpha 12$ /ATF2 à l'aide de souris transgénique est prématurée en l'état. En effet, seules les souris  $G\alpha 12^{-/-}$ ,  $MEKK1^{-/-}$  et  $JNK2^{-/-}$  sont viables (mortalité embryonnaire pour les animaux  $MKK7^{-/-}$ ,  $Rac1^{-/-}$  ou  $Cdc42^{-/-}$ ) (Chen et al, 2000; Glogauer et al, 2003; Gu et al, 2002; Tournier et al, 2001; Yang et al, 1998b; Yujiri et al, 2000). De plus ces protéines sont impliquées dans de multiples fonctions. Il sera donc difficile de dissocier les conséquences propres d'une carence en leucine vis-à-vis des effets pléiotropiques intrinsèques aux différents KO. Il serait plus judicieux d'identifier tout d'abord *in vitro* le récepteur activant la voie  $G\alpha 12$ /ATF2 puis de procéder à l'invalidation de celui-ci chez la souris. A partir de ce modèle, nous pourrions déterminer les phénotypes du knock-out et étudier sa réponse à une carence nutritionnelle en leucine. De plus, des analyses haut-débits (transcriptomiques, protéomiques ou métabolomiques) seront réalisées et croisées avec les résultats déjà obtenus chez les souris KO pour mGCN2. Cet outil pourrait permettre de mettre en lumière de nouvelles voies de signalisation activées par ce récepteur.

#### **4.2. Autres voies de signalisation initiées par $G\alpha 12$ en réponse à une carence en acides aminés**

La voie de signalisation  $G\alpha 12$ /ATF2 est activée par une limitation en leucine. Ceci implique qu'elle régule l'expression des gènes impliqués dans la réponse et/ou l'adaptation cellulaire à une carence en acides aminés. Parmi ces gènes, nombre d'entre eux contrôlent le métabolisme azoté. Cependant, l'initiation de la voie au niveau  $G\alpha 12$  peut diverger sur d'autres cibles protéiques (Figure 72). De même, chacun des intermédiaires de la voie  $G\alpha 12$ /ATF2 peut activer de nouvelles signalisations parallèles à  $G\alpha 12$ /ATF2, en réponse à une privation en leucine. Il est alors possible que cette même carence régule également d'autres grandes fonctions physiologiques. Dans un premier temps, les études transcriptomiques des cellules ATF2 A/A (forme non phosphorylable d'ATF2) vont permettre de déterminer les sous-groupes de gènes régulés par la carence en acides aminés et dépendants de la phosphorylation d'ATF2. La même expérience peut également être réalisée dans un modèle cellulaire invalidé

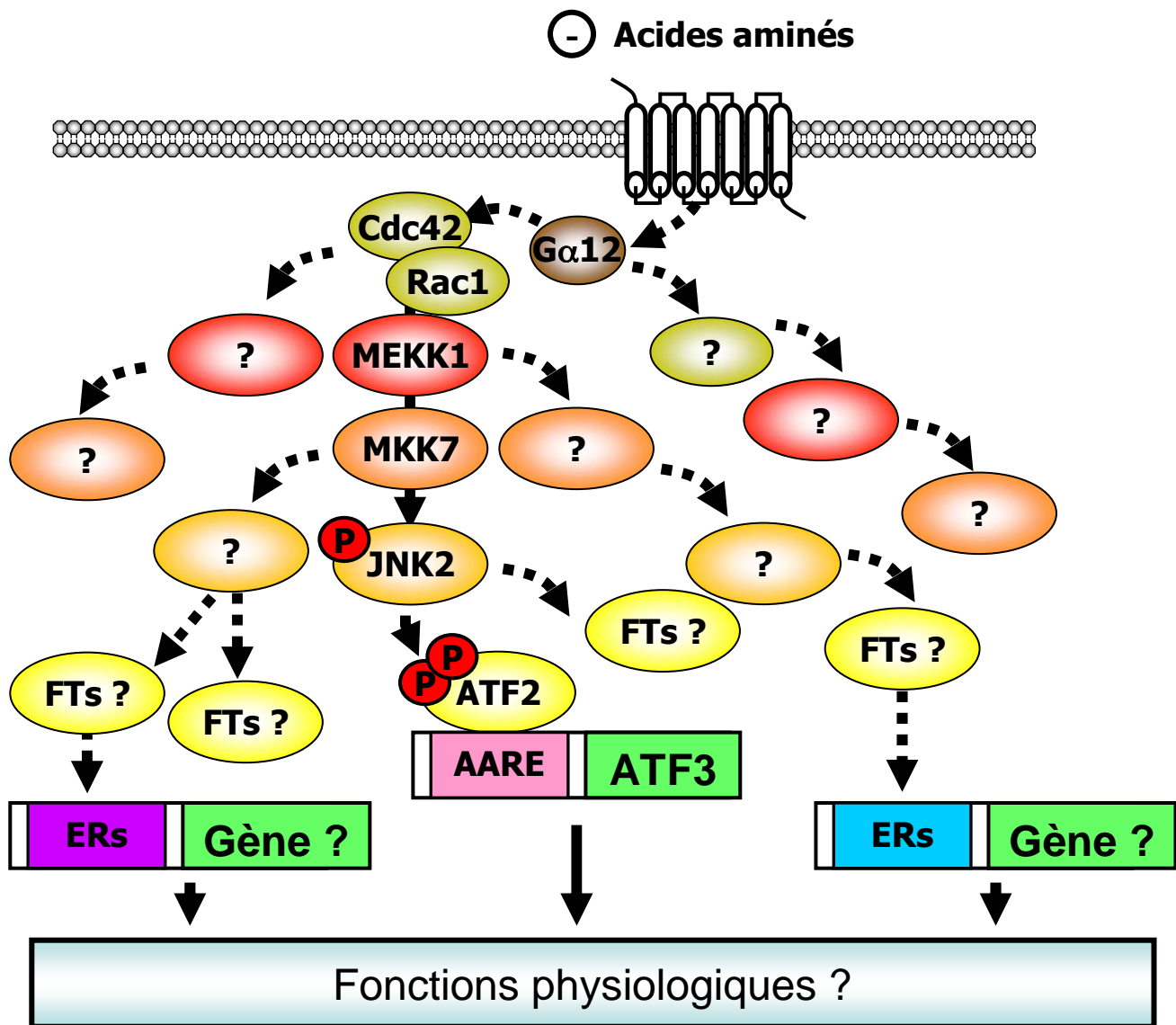


Figure 72: Hypothèse de travail dans la détermination de voies de signalisation parallèles à la voie Gα12/ATF2. FTs :Facteurs de transcription, ERs : Eléments de réponse



pour JNK2 ou pour chacun des éléments de la voie  $G\alpha_{12}$ /ATF2. Toutefois, l'activateur le plus en amont de ces voies potentielles sera le RCPG couplé à  $G\alpha_{12}$ . Leurs identifications pourront donc être possibles qu'après avoir déterminé puis invalidé le récepteur couplé à cette protéine G.

# CONCLUSION GENERALE

Les résultats obtenus au cours de cette thèse ont permis de déterminer une voie de signalisation activée par la carence en acides aminés. Cette voie Gα12/ATF2 régule la phosphorylation d'ATF2 au niveau de ces résidus activateurs (thréonines 69 et 71) et joue un rôle important dans la régulation de la transcription des gènes ATF2-dépendants *ATF3* et *CHOP*. En revanche, plusieurs questions subsistent vis-à-vis de la fonction de cette phosphorylation dans un contexte de privation en acides aminés ainsi que les fonctions physiologiques qu'elle régule. Enfin, les régulateurs de la voie Gα12/ATF2 et surtout le senseur de cette voie restent à déterminer. Ceci a permis d'ouvrir de nouvelles perspectives de recherche au sein du laboratoire.

De plus, il n'est pas exclu que d'autres voies de signalisation soient également activées en réponse à la carence en leucine. En effet, les travaux de Guo *et al.* (Guo & Cavener, 2007) montrent que mGCN2 protège de l'augmentation de la lipogenèse induite *in vivo* par une carence en leucine. Les auteurs rapportent également que ce phénotype est indépendant du facteur ATF4. Ceci suggère donc que d'autres facteurs de transcription sont activés en réponse à une privation en acides aminés.

Enfin, il sera important d'évaluer précisément quels sont les tissus directement touchés par une carence alimentaire en acides aminés, et de confirmer *in vivo* la présence des mécanismes identifiés jusqu'ici en culture cellulaire afin de valider définitivement notre modèle. Ceci permettra également de déterminer de nouveau gènes cibles régulés par les acides aminés et de pouvoir établir un lien entre le métabolisme protéique et d'autres fonctions physiologiques (régulation du métabolisme, de la croissance, de l'appétit...) ou physiopathologiques. L'approfondissement de ces connaissances pourra participer à la définition d'une nutrition préventive afin de comprendre et de lutter contre certains dérèglements métaboliques.

# ANNEXES

## **Articles scientifiques**

**Amino acid limitation regulates the expression of genes involved in several specific biological processes through GCN2-dependent and GCN2-independent pathways.**

Deval C, **Chaveroux C**, Maurin AC, Cherasse Y, Parry L, Carraro V, Milenkovic D, Ferrara M, Bruhat A, Jousse C, Fafournoux P.

FEBS J. 2009 Feb;276(3):707-18.

# Amino acid limitation regulates the expression of genes involved in several specific biological processes through GCN2-dependent and GCN2-independent pathways

Christiane Deval, Cédric Chaveroux, Anne-Catherine Maurin, Yoan Cherasse, Laurent Parry, Valérie Carraro, Dragan Milenkovic, Marc Ferrara, Alain Bruhat, Céline Jousse and Pierre Fafournoux

Unité de Nutrition Humaine, Equipe Gènes-Nutriments, Saint Genès Champanelle, France

## Keywords

amino acid; GCN2; gene expression; rapamycin; TORC1

## Correspondence

P. Fafournoux, UMR 1019, Unité Nutrition Humaine, INRA de Theix, 63122 St Genès Champanelle, France  
Fax: +33 4 73 62 47 55  
Tel: +33 4 73 62 45 62  
E-mail: fpierre@clermont.inra.fr

(Received 6 May 2008, revised 29 October 2008, accepted 25 November 2008)

doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06818.x

Evidence has accumulated that amino acids play an important role in controlling gene expression. Nevertheless, two components of the amino acid control of gene expression are not yet completely understood in mammals: (a) the target genes and biological processes regulated by amino acid availability, and (b) the signaling pathways that mediate the amino acid response. Using large-scale analysis of gene expression, the objective of this study was to gain a better understanding of the control of gene expression by amino acid limitation. We found that a 6 h period of leucine starvation regulated the expression of a specific set of genes: 420 genes were up-regulated by more than 1.8-fold and 311 genes were down-regulated. These genes were involved in the control of several biological processes, such as amino acid metabolism, lipid metabolism and signal regulation. Using GCN2<sup>-/-</sup> cells and rapamycin treatment, we checked for the role of mGCN2 and mTORC1 kinases in this regulation. We found that (a) the GCN2 pathway was the major, but not unique, signaling pathway involved in the up- and down-regulation of gene expression in response to amino acid starvation, and (b) that rapamycin regulates the expression of a set of genes that only partially overlaps with the set of genes regulated by leucine starvation.

In mammals, amino acids exhibit two important characteristics: (a) nine amino acids are essential for health in adult humans, and (b) amino acids are not stored, which means that essential amino acids must be obtained from the diet. Consequently, amino acid homeostasis may be altered in response to malnutrition [1,2] with two major consequences: (a) a large variation in blood amino acid concentrations, and (b) a negative nitrogen balance. In these situations, individuals must adjust several physiological functions involved in the defense/adaptation response to amino acid limitation. For example, after feeding on an amino acid-

imbalanced diet, an omnivorous animal recognizes the amino acid deficiency and subsequently develops a taste aversion [3]. It has been shown that the mechanism underlying the recognition of protein quality acts through the sensing of free circulating amino acids resulting from the intestinal digestion of proteins [4,5]. Another example of the detection of the lack of an amino acid is metabolic adaptation to cope with episodes of protein malnutrition. In these circumstances, amino acid availability regulates fatty acid homeostasis in the liver during the deprivation of an essential amino acid [6]. These examples demonstrate that

## Abbreviations

ARE, A/U-rich element; aRNA, amplified RNA; Asns, asparagine synthetase; ATF4, activating transcription factor 4; CAT-1, cationic amino acid transporter-1; Chop, CCAAT/enhancer binding protein homologous protein; Cy, cyanine; Dusp16, dual specificity phosphatase 16; Egr1, early growth response 1; GO, gene ontology; Hmgcs1, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 1; Idi1, isopentenyl-diphosphate delta isomerase 1; Ifrd1, interferon-related developmental regulator 1; MEF, mouse embryonic fibroblast; Ndgr1, N-myc downstream-regulated gene 1; Sqstm1, sequestosome 1; Trb3, tribbles homolog 3.

mammals regulate several physiological functions to adapt their metabolism to the amino acid supply. It has been shown that nutritional and metabolic signals play an important role in controlling gene expression and physiological functions. However, currently, the mechanisms involved in this process are not completely understood in mammals [7].

Conversely, in prokaryotes and lower eukaryotes, the regulation of gene expression in response to changes in the nutritional environment has been well documented. For example, the regulation of gene expression in response to amino acid availability has been studied extensively in yeast [8]. The GCN2 and TOR kinases sense the intracellular concentration of amino acids. In addition, yeast cells possess an amino acid sensing system, localized at the plasma membrane, that transduces information regarding the presence of extracellular amino acids [9,10]. In addition to these general control processes, yeast uses three specific control processes, whereby a subset of genes is coordinately induced by starvation of the cell for one single amino acid [11].

In mammals, our knowledge of the regulation of gene expression by amino acid availability is more limited. Investigations at the molecular level have thus far focused only on the translational control of cationic amino acid transporter-1 (CAT-1) expression [12,13] and the transcriptional regulation of asparagine synthetase (Asns) [14] and CCAAT/enhancer binding protein homologous protein (Chop) [15] (for a review, see [7,16]). Chop and Asns gene transcription is regulated by a *cis*-element located in the promoter of these genes, which is known as the amino acid response element [14,17]. The signaling pathway responsible for this regulation involves the kinase GCN2, which is activated by free tRNA accumulation during amino acid starvation [7,18]. Once activated, GCN2 phosphorylates the translation initiation factor, eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$ , thereby impairing the synthesis of the 43S preinitiation complex and thus strongly inhibiting translation initiation. Under these circumstances, activating transcription factor 4 (ATF4) is translationally up-regulated as a result of the presence of upstream ORFs in the 5'-UTR of its mRNA [19,20]. ATF4 then binds the amino acid response element and induces the expression of target genes [18,21,22]. It has also been shown that mTORC1 inhibition by amino acid starvation affects gene expression, but the molecular mechanisms involved in this process have not been described [23].

Two components of the amino acid control of gene expression are not yet completely understood in mammals: (a) the genes and biological processes regulated by amino acid availability, and (b) the signaling path-

ways that mediate the amino acid response. In this study, using transcriptional profiling, we identified a set of genes regulated by amino acid depletion. We also showed that the GCN2 pathway is the major, but not unique, signaling pathway involved in the up- and down-regulation of gene expression in response to amino acid starvation.

## Results

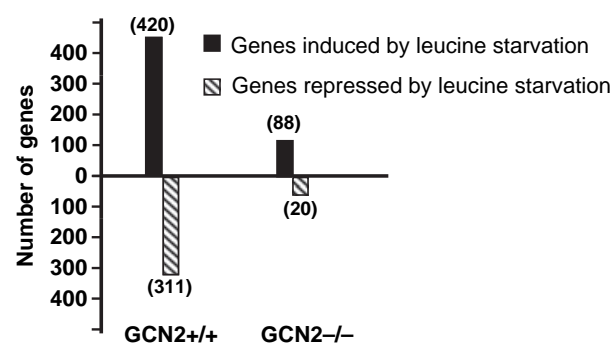
### Amino acid starvation triggers changes in gene expression

In order to identify amino acid-regulated genes, mouse embryonic fibroblast (MEF) cells were starved of leucine. A 6 h incubation was chosen in order to capture rapid changes in gene expression in response to amino acid deficiency. Labeled probes synthesized from cellular mRNA were hybridized to oligonucleotide microarrays capable of detecting the expression of about 25 000 different mouse genes and expressed sequence tags. We found that about 85% of the genes represented on the microarray were expressed in MEF cells. We considered that a gene was expressed when its corresponding spot gave a measured signal threefold higher than the background in the control medium. We then measured the effect of amino acid depletion on gene expression. The results are given as the induction ratio between the expression levels measured in amino acid-deficient medium versus the control medium.

In wild-type MEF cells (GCN2+/+), 731 genes were regulated by leucine starvation: 420 genes were up-regulated by more than 1.8-fold and 311 genes were down-regulated by more than 1.8-fold (Fig. 1 and Table S1). These genes were classified into functional categories according to the gene ontology (GO) annotation (Table 1). This analysis revealed that the up-regulated genes belonged to GO categories such as the regulation of transcription, defense response, transport and signal transduction. The down-regulated genes were involved in lipid metabolic processes, regulation of transcription, signal transduction and carbohydrate metabolic processes. These results suggest that amino acid shortage could regulate specific physiological functions.

### The expression of a set of genes is regulated by amino acid starvation independent of the GCN2 pathway

In mammals, the GCN2 pathway is the only mechanism described at the molecular level that is involved



**Fig. 1.** Global behavior of gene expression on leucine starvation in GCN2<sup>+/+</sup> and GCN2<sup>-/-</sup> MEF cells. The number of genes exhibiting changes in their expression level after 6 h of leucine starvation. Filled bars, expression level increased by more than 1.8-fold; hatched bars, expression level decreased by more than 1.8-fold. The details of the experiment are given in Table S1.

in the regulation of gene expression in response to amino acid starvation. However, comparison of the regulatory mechanisms involved in the control of gene expression by amino acid availability between yeast and mammals suggests that one or more control processes other than the GCN2 pathway could be involved in mammalian cells (see introduction). To address this question, we used MEF cells either expressing or not expressing GCN2 (GCN2<sup>+/+</sup> and GCN2<sup>-/-</sup> cells).

In GCN2<sup>-/-</sup> cells, 108 genes were regulated by amino acid starvation: 88 genes were induced and 20 genes were repressed by more than 1.8-fold in response to amino acid starvation (Fig. 1 and Table S1). Focusing on the effect of GCN2, we considered that a gene was GCN2 dependent when it was not regulated in GCN2<sup>-/-</sup> cells, and GCN2 independent when more than 75% of its induction (or repression) in response to amino acid starvation was maintained in GCN2<sup>-/-</sup> cells. A gene was considered to be partially GCN2 dependent if its induction ratio was decreased but remained higher than 1.8-fold in GCN2<sup>-/-</sup> cells. Among the genes regulated by amino acid starvation, 61% were GCN2 dependent, 18% were GCN2 independent and 21% were partially GCN2 dependent (Table S1). As the GCN2 pathway regulates gene expression via transcription factor ATF4, we determined the ATF4 dependence of a few GCN2-dependent genes [Chop, Asns, tribbles homolog 3 (Trb3) and system A transporter 2]. Our results showed that these genes were no longer regulated by amino acid starvation in ATF4<sup>-/-</sup> cells (data not shown), suggesting that GCN2-dependent regulation of these genes was accomplished via the function of ATF4. Taken together, these results demonstrate that the GCN2

**Table 1.** Distribution of leucine starvation-responding mRNA categorized across GO biological processes. For each GO term, the number of genes up- or down-regulated in response to amino acid starvation is given.

Ontology ID	Ontology terms	Up regulated genes	Down regulated genes
GO: 0045449	Regulation of transcription	49	19
GO: 0006952	Defense response	41	8
GO: 0006810	Transport	25	14
GO: 0007145	Signal transduction	23	19
GO: 0006412	Translation	20	9
GO: 0008283	Cell proliferation	17	4
GO: 0006508	Proteolysis	16	9
GO: 0016310	Phosphorylation	14	16
GO: 0006418	tRNA aminoacylation for protein translation	11	2
GO: 0006629	Lipid metabolic process	10	25
GO: 0006915	Apoptosis	9	7
GO: 0006139	Nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	8	2
GO: 0008652	Amino acid biosynthetic process	6	1
GO: 0007010	Cytoskeleton organization and biogenesis	6	5
GO: 0005975	Carbohydrate metabolic process	5	8
GO: 0006464	Protein modification process	5	8
GO: 0006865	Amino acid transport	5	2
GO: 0006457	Protein folding	4	6
GO: 0006371	mRNA splicing	3	1
GO: 0016072	rRNA metabolic process	5	3
GO: 0007155	Cell adhesion	2	7
GO: 0006397	Pre-mRNA processing	2	0
GO: 0007154	Cell communication	2	0
GO: 0006259	DNA metabolic process	2	1
GO: 0022008	Neurogenesis	2	2
GO: 0001525	Angiogenesis	1	2
GO: 0051726	Regulation of cell cycle	1	3
GO: 0006333	Chromatin assembly/disassembly	1	2
GO: 0006732	Coenzyme metabolic process	1	2
GO: 0006260	DNA replication	0	2
GO: 0006069	Glycolysis	0	5
GO: 0006936	Muscle contraction	0	2
	Other	12	13
	Biological process unclassified (EST and Riken)	112	102

pathway is the major, but not unique, mechanism involved in the amino acid control of gene expression in mammals.

**Table 2.** Enrichment of the amino acid-regulated genes according to the biological process in which they are involved. Enrichment was determined using FatiGO software. (A) and (B) show the significantly enriched GO categories calculated from GCN2+/+ and GCN2−/− cells, respectively. In (B), the GO terms already present in (A) are not shown. For each cell line, only the most relevant and non-redundant terms were reported. The FatiGO level is indicated for each GO category. A given GO category was considered to be significantly enriched when its enrichment was higher than 1.8 and  $P < 0.05$  (indicated in bold). The enrichment for a given GO category was computed as the ratio of the distribution of the amino acid-regulated genes\* versus the distribution of the genes spotted onto the microarray\*\*. \*Percentage of the representation of one GO term among all the amino acid-regulated genes. \*\*Percentage of the representation of one GO term among all the genes present on the micro-array.

Ontology ID	Ontology terms	GO level	Gcn2+/+ enrichment	Gcn2+/+ <i>P</i> value	Gcn2−/− enrichment	Gcn2−/− <i>P</i> value
<b>A</b>						
GO: 0009070	Serine family amino acid biosynthetic process	8	<b>15</b>	3.39e-02	0	1
GO: 0006695	Cholesterol biosynthetic process	9	<b>8.5</b>	2.20e-02	13.2	4.23e-01
GO: 0006418	tRNA aminoacylation for protein translation	9	<b>6.3</b>	1.12e-04	2.1	1
GO: 0007005	Mitochondrion organization and biogenesis	5	<b>6.3</b>	2.44e-02	15.9	1.31e-01
GO: 0006469	Negative regulation of protein kinase activity	8	<b>4.8</b>	3.76e-02	<b>12.5</b>	5.00e-02
GO: 0051094	Positive regulation of developmental process	5	<b>4.6</b>	4.45e-02	10.3	2.23e-01
GO: 0044262	Main pathways of carbohydrate metabolic process	6	<b>4.3</b>	1.45e-02	6.7	4.04e-01
GO: 0006006	Glucose metabolic process	8	<b>3.8</b>	2.47e-02	3.5	1
GO: 0008285	Negative regulation of cell proliferation	6	<b>3.4</b>	2.85e-02	5.1	5.68e-01
GO: 0000074	Regulation of progression through cell cycle	6	<b>2.7</b>	1.12e-04	3.9	1.30e-01
GO: 0006955	Immune response	4	<b>2.3</b>	1.45e-02	2.3	1.45e-02
GO: 0009887	Organ morphogenesis	6	<b>2.1</b>	2.60e-02	3.0	3.55e-01
GO: 0043067	Regulation of programmed cell death	8	<b>2.0</b>	1.45e-02	2.0	1
GO: 0006915	Apoptosis	8	<b>1.8</b>	1.68e-02	2.6	2.15e-01
<b>B</b>						
GO: 0006950	Response to stress	3	1.7	5.51e-02	<b>3.8</b>	1.91e-02
GO: 0030154	Cell differentiation	4	1.6	1.56e-03	<b>2.6</b>	1.91e-02
GO: 0050789	Regulation of biological process	3	1.3	2.42e-02	<b>1.9</b>	7.72e-03

We measured the enrichment of the amino acid-responding genes in both cell lines, and the results are shown in Table 2. It is noticeable that the biological processes regulated by amino acid starvation in GCN2−/− cells differed clearly from those regulated in wild-type cells. For example, the genes involved in amino acid metabolism were not regulated by amino acid starvation in GCN2−/− cells, whereas enrichment for the genes involved in cholesterol biosynthesis processes remained high in these cells. These results demonstrate that GCN2 may be involved in the regulation of particular physiological functions (such as amino acid metabolism) when there is insufficient amino acid availability.

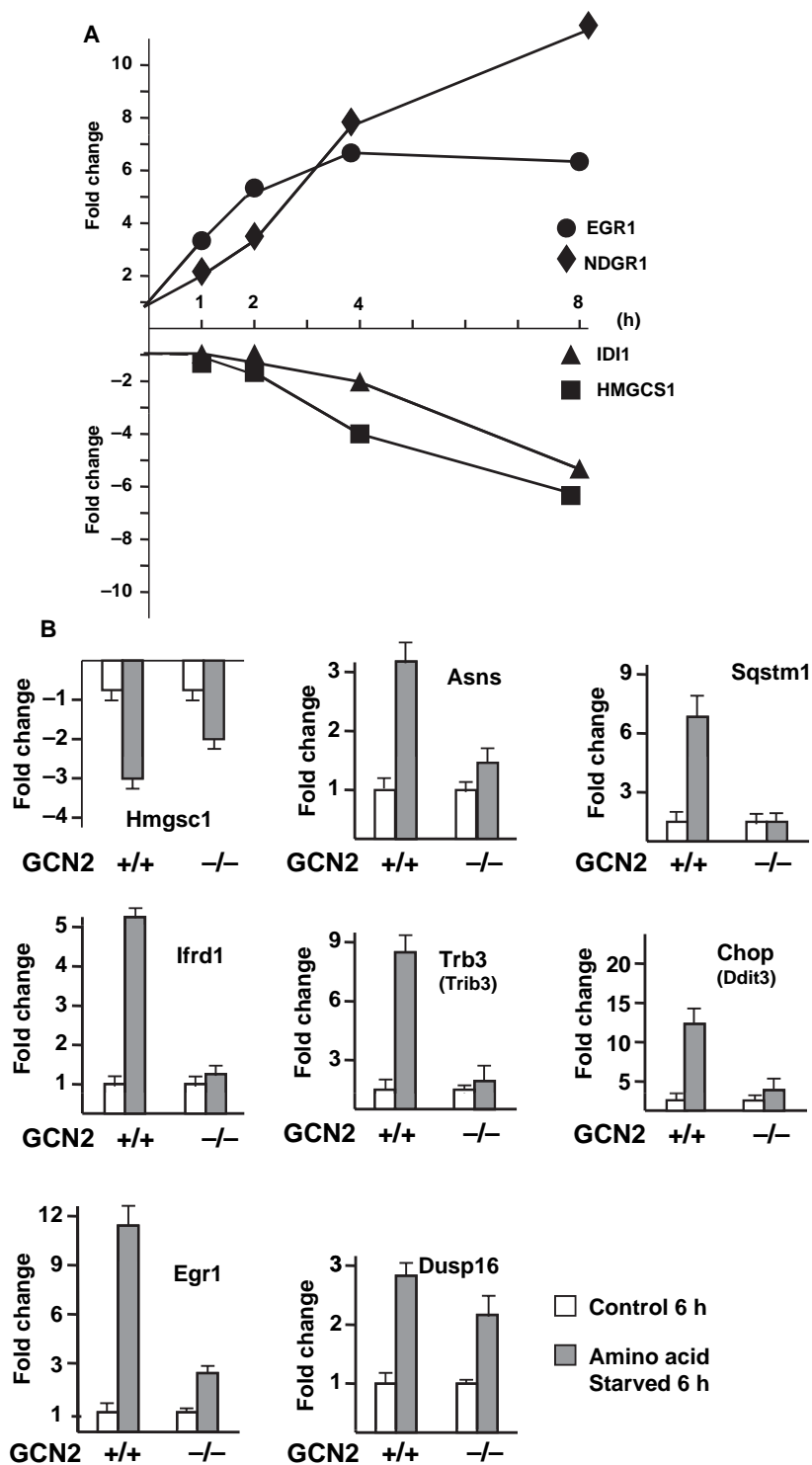
### Validation of the microarray results

As a genome-wide analysis over a time course would have been very laborious, we chose a 6 h incubation period to perform these studies. This time window was chosen to: (a) avoid secondary effects of amino acid starvation, and (b) to measure gene expression accurately. We performed a kinetic analysis of the expres-

sion of four genes previously identified [24] as belonging to different biological processes (Fig. 2A). mRNA levels of early growth response 1 (Egr1) and N-myc downstream-regulated gene 1 (Ndgr1) were up-regulated in response to leucine starvation and increased as a function of time. Isopentenyl-diphosphate delta isomerase 1 (Idi1) and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 1 (Hmgcs1) mRNA contents were down-regulated. The progressive change in the mRNA contents of these genes shows that the regulatory mechanisms activated by leucine starvation are turned on rapidly after amino acid removal (about 2–4 h). It also suggests that the regulation of gene expression by leucine limitation is not caused by a secondary effect of amino acid starvation. These data reinforce the choice of a 6 h time window to perform microarray analysis.

In order to confirm the data obtained using microarrays, we measured the expression of eight genes regulated by amino acid starvation using quantitative RT-PCR. We selected genes that were either repressed (Hmgcs1) by amino acid starvation or induced by amino acid starvation in a GCN2-dependent [Asns,





**Fig. 2.** Induction by amino acid starvation of selected genes. (A) Time course analysis of the mRNA content of *Egr1*, *Ndgr1* and *Hmgcs1* in response to leucine starvation. The gene expression level was quantified by quantitative RT-PCR. The results are given as fold changes. (B) *GCN2*<sup>+/+</sup> and *GCN2*<sup>-/-</sup> MEF cells were incubated for 6 h in either control medium or medium starved of leucine. RNA was then extracted and the gene expression levels were quantified by quantitative RT-PCR. Oligonucleotide sequences are given in Materials and methods. Two independent experiments were performed. *Trb3*, *Chop* and *Egr1* belong to the 'regulation of transcription' biological process. *Hmgsc1*, *Asns*, *Sqstm1*, *lfrd1* and *Dusp16* are associated with a lipid metabolic process, amino acid biosynthetic process, defense response, neurogenesis and phosphorylation biological process, respectively.

sequestosome 1 (*Sqstm1*), interferon-related developmental regulator 1 (*lfrd1*), partially *GCN2*-independent (*Egr1*, *Trb3*, *Chop*) or *GCN2*-independent (dual specificity phosphatase 16, *Dusp16*) manner. Figure 2B

shows that the quantitative RT-PCR data are in good agreement with the data presented in Table S1, thus demonstrating the validity of the microarray experiments.

### The mechanisms regulating GCN2-independent gene expression by amino acid starvation involve both transcriptional and post-transcriptional regulation

It has been documented that the induction by amino acid starvation of Chop, Atf3 or Cat-1 [15,25,26] involves regulation at the level of transcription and mRNA stability. The molecular mechanisms involved in the regulation of GCN2-independent genes are not understood. We investigated the role of transcription in the amino acid regulation of three genes that were either not or only partially regulated by the GCN2 pathway. To investigate the changes in the transcription rate of one gene, the level of unspliced pre-mRNA was measured. Given that introns are rapidly removed from heterogeneous nuclear RNA during splicing, this procedure is considered to be a means of measuring transcription [27,28]. Quantitative RT-PCR analysis with specific primers spanning an intron–exon junction was used to amplify a transient intermediate of the mRNA, whereas primers located in two different exons were used to amplify the mature mRNA. We chose to study the regulation of chemokine (C-X-C motif) ligand 10 (Cxcl10), Egr1 (partially GCN2 independent) and Dusp16 (GCN2 independent) because the structures of these genes were known. In order to avoid any interference with the GCN2 pathway, we performed this experiment in GCN2<sup>−/−</sup> cells.

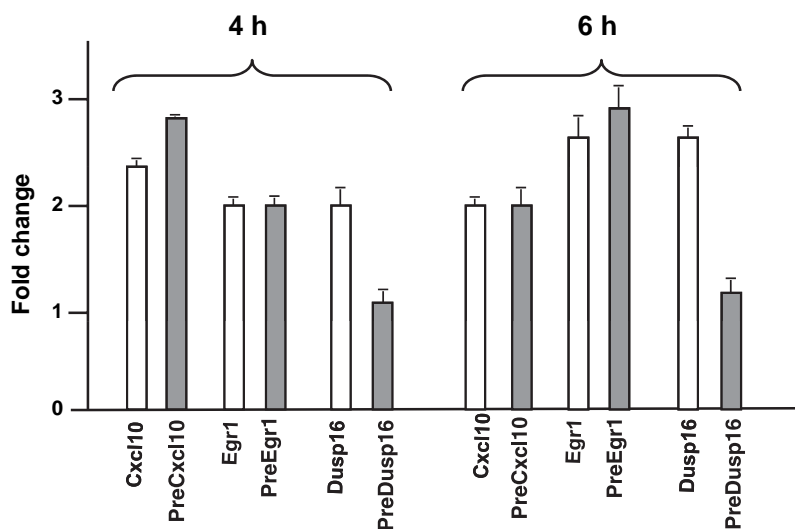
Figure 3 shows that both the pre-mRNA and mature mRNA of Egr1 and Cxcl10 are similarly regulated by amino acid starvation, suggesting that the regulation occurs mainly at the transcriptional level. By contrast, the amount of pre-mRNA of Dusp16 is not

affected by amino acid starvation, but the amount of mature transcript is increased. These results suggest that the Dusp16 transcript is probably regulated at a post-transcriptional level, such as mRNA stabilization, splicing or nucleocytoplasmic transport. These results show that the mechanisms responsible for the amino acid regulation of gene expression in GCN2<sup>−/−</sup> cells involve both transcription and/or mRNA stabilization and/or processing. However, we cannot exclude the possibility that regulatory processes, such as mRNA stabilization or processing, may also be regulated by the GCN2 pathway.

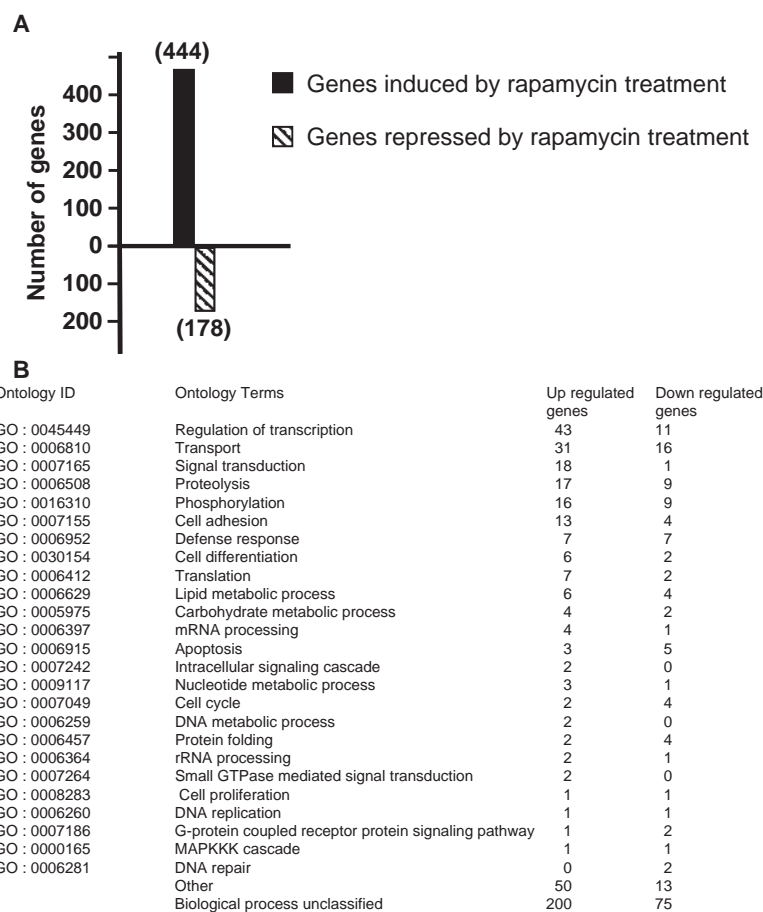
### Rapamycin triggers changes in gene expression

In addition to GCN2, cells possess another amino acid-sensitive regulatory pathway, mTORC1, which is inhibited by amino acid starvation. In order to address the relative contribution of mTORC1 to the control of gene expression, we used MEF cells (GCN2<sup>+/+</sup> cells) to generate transcriptional profiles in response to rapamycin treatment (TORC1 inhibitor). For this experiment, the RNG microarrays were no longer available, and so the experiment was performed using Operon microarrays.

Cells were incubated for 6 h in a medium containing 50 nM rapamycin; the RNA was extracted and analyzed as described in Materials and methods. It was found that 622 genes were regulated by rapamycin treatment: 444 genes were up-regulated by more than 1.8-fold, and 178 genes were down-regulated by more than 1.8-fold (Fig. 4A and Table S2). These genes were classified into functional categories according to GO annotation (Fig. 4B). This analysis revealed that the up- and down-regulated genes belonged to GO cate-



**Fig. 3.** Regulation of unspliced mRNA of Cxcl10, Dusp16 and Egr1 in response to amino acid starvation. GCN2<sup>−/−</sup> cells were incubated for 4 and 6 h in either a control medium or a medium devoid of leucine. Quantitative RT-PCR analyses were performed using specific primers in order to detect both primary transcripts and mature mRNA (see Materials and methods for details). Three independent experiments were performed.



**Fig. 4.** Global behavior of gene expression on rapamycin treatment in MEF cells. (A) Number of genes exhibiting changes in their expression level after 6 h of rapamycin treatment (50 nM). Filled bars, expression level increased by more than 1.8-fold; hatched bars, expression level decreased by more than 1.8-fold. The details of the experiment are given in Table S2. (B) Distribution of the rapamycin-responding mRNAs categorized across GO biological processes.

gories such as regulation of transcription, transport and signal transduction.

A comparison of the transcriptional profile induced by rapamycin and amino acid deprivation revealed that only 20 genes were regulated by both treatments (Table S3). Rapamycin treatment and amino acid starvation had similar effects on the expression of 12 genes and opposite effects on the regulation of eight genes. These results suggest that rapamycin inhibition of TORC1 modifies the expression of a set of genes that only partially overlaps with the set of genes regulated by amino acid deprivation.

## Discussion

There is growing evidence that amino acids play an important role in controlling gene expression. Using transcriptional profiling, the objective of this work was to gain a better understanding of the amino acid control of gene expression. As our aim was to study the effects of short-term amino acid starvation, our experimental protocol was designed to avoid the long-term and secondary effects of amino acid starvation.

Our data demonstrate that a 6 h amino acid starvation regulates the expression of a specific set of genes: of the 25 000 genes spotted onto the microarray, 0.55% were up-regulated and 0.4% were down-regulated in fibroblasts (> 1.8-fold). The expression levels of the vast majority of genes (about 99%) remained unaffected by amino acid starvation.

The mechanisms involved in the up-regulation of gene expression by amino acid starvation in mammals have been partially identified. Conversely, the signaling pathways involved in the down-regulation of gene expression remain unknown. The low percentage (0.4%) of genes down-regulated by amino acid limitation suggests that specific regulatory mechanisms are involved. Our results clearly show that GCN2 is involved in this process, at least for a certain set of genes. The simplest hypothesis to explain the role of this pathway is that GCN2 regulates ATF4, which, in turn, negatively regulates transcription via the cAMP response element, as shown in human enkephalin promoter and other genes [29]. Another possibility may be that a gene induced by the GCN2/ATF4 pathway could, in turn, inhibit gene expression. Further experi-

ments are required to understand the molecular mechanisms involved in the down-regulation of gene expression by amino acid limitation.

Our data demonstrate that, in addition to the GCN2 pathway, other signaling mechanisms are involved in the control of gene expression (up and down) in response to amino acid limitation. The downstream molecular mechanisms involved in this process could require transcriptional regulation and/or stabilization of mRNA. This latter mechanism has been described for the amino acid-dependent regulation of several genes, including Chop, Atf3, Cat-1 and insulin-like growth factor binding protein 1 (Igfbp1), making it possible that amino acid availability may affect a mechanism regulating transcript stability of a larger set of genes [15,25,26,30,31]. Based on an analysis of the literature, the regulation of mRNA half-life has mainly been studied by focusing on the A/U-rich element (ARE) instability determinant of certain mRNAs. In particular, there has been much discussion of a link between ARE-dependent mRNA degradation and the inhibition of protein synthesis [31,32]. However, the universality of such a translation-coupled ARE-mediated decay has been discussed and remains unclear [33,34]. The most plausible hypothesis to explain mRNA stability would be that many factors contribute to these multistep processes, including the metabolic conditions of the cell, nature of the stimulus, RNA binding factors and the sequence of the target mRNA [35].

Another amino acid sensing mechanism involves mTORC1. Therefore, it is tempting to speculate that the mTORC1 pathway could be involved in the GCN2-independent regulation of gene expression. Our results show that rapamycin, an inhibitor of mTORC1, regulates the expression of a set of genes almost as large as the set of genes regulated by amino acid deprivation (622 versus 731 genes). However, only 12 genes are regulated by both rapamycin and amino acid starvation, whereas both of these stimuli are known to inhibit mTORC1. Several hypotheses could explain these results: (a) rapamycin may regulate gene expression through an mTORC1-independent mechanism, or (b) amino acid deprivation may not inhibit mTORC1 activity as much as the inhibition caused by rapamycin, and therefore may not regulate gene expression to the same extent. We cannot exclude the possibility that different extents of inhibition of mTORC1 signaling could account for the induction of distinct sets of genes.

Recently, Peng *et al.* [23] have shown that the transcriptional profile induced by rapamycin exhibits some similarities to that induced by leucine deprivation.

However, rapamycin and amino acid starvation had opposite effects on the expression of a large group of genes involved in the synthesis, transport and use of amino acids. The experimental procedures may explain the discrepancy between our results and those obtained by Peng *et al.* [23]. Indeed, we focused our studies on short-term amino acid starvation and rapamycin treatment, whereas Peng *et al.* used longer treatment periods (12 and 24 h); moreover, the experimental conditions (cellular model and rapamycin treatment) were different. Taken together, these results demonstrate that rapamycin and amino acid deprivation do not regulate the same pattern of genes, suggesting that the mTORC1 and GCN2 pathways do not regulate the same physiological functions. In addition, it is clear that the cellular context and treatment conditions are also important factors in the regulation of gene expression by amino acid starvation and/or rapamycin [24]. Further investigations are needed to understand the role of mTORC1 kinase in the regulation of gene expression by amino acid availability.

The enrichment of amino acid-regulated genes according to their biological processes reveals that amino acid limitation regulates groups of genes that are involved in amino acid and protein metabolism, lipid and carbohydrate metabolism and various processes related to the stress response. These adaptive responses enable the cell to become accustomed to low amino acid availability. It is conceivable that, *in vivo*, animals modulate their metabolism in order to adapt to a diet partially or totally devoid of a given essential amino acid.

Our data suggest that the GCN2 pathway is directly involved in the regulation of amino acid and protein metabolism, as many of the genes involved in these processes are not regulated in GCN2<sup>-/-</sup> cells. These results are in good agreement with those of Harding *et al.* [18], who showed that the transcription factor ATF4 (downstream of GCN2) regulates the transport and metabolism of amino acids. Taken together, these results demonstrate that amino acids can regulate their own metabolism as a function of their availability. In this process, GCN2 is the sensor for amino acid limitation.

A previous study has shown that amino acid starvation can regulate lipid metabolism [6]. Our results reinforce these data, as they show that amino acid starvation affects the expression of genes involved in various biological processes related to lipids and/or energetic processes. In addition, data from Cavener's group clearly show that GCN2 is involved in the amino acid regulation of lipid metabolism (mainly lipogenesis). Our data suggest that amino acid starva-

tion may also control lipid metabolism through a GCN2-independent process. Indeed, in GCN2<sup>-/-</sup> cells, a number of genes involved in carbohydrate or lipid metabolism (particularly in cholesterol biosynthetic processes) are regulated by amino acid starvation.

Further investigations are necessary to determine the relevance of the amino acid regulation of the genes involved in carbohydrate and lipid metabolism. In particular, the regulatory role of amino acids should be addressed in tissues and cells involved in metabolic processes (liver, adipose tissue, muscle), and the GCN2-independent pathway(s) controlled by amino acid availability, as well as the regulated metabolic processes, should be identified.

The idea that amino acids can regulate gene expression is now well established. However, further work is needed to understand the molecular steps by which the cellular concentration of an individual amino acid can regulate gene expression. The molecular basis of gene regulation by dietary protein intake is an important field of research for studying the regulation of the physiological functions of individuals living under conditions of restricted or excessive food intake.

## Materials and methods

### Cell cultures and treatment conditions

GCN2<sup>+/+</sup> and GCN2<sup>-/-</sup> MEF cells were kindly provided by D. Ron (New York University, NY, USA). For amino acid starvation experiments, cells were starved of leucine. F12/DMEM without amino acids was used. The medium was supplemented with individual amino acids at the concentration of the control medium. In all experiments involving amino acid starvation, dialyzed serum was used.

### RNA extraction

Total RNA was prepared using the RNeasy total RNA Mini kit (Qiagen France, Les Ulis, France). RNA concentration and integrity were assessed using the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Massy, France). High-quality RNAs with an  $A_{260}/A_{280}$  ratio above 1.9 and intact ribosomal 28S and 18S bands were utilized for microarray experiments and real-time RT-PCR.

### Oligo microarray

A mouse oligonucleotide microarray containing 25 000 genes and expressed sequence tags were used to profile the change in gene expression of different cultured cells starved of essential amino acids. Microarray chips were obtained

from RNG (Réseau National des Génopoles, Evry, France). For rapamycin microarray experiments, mouse Op Arrays (Operon Biotechnologies GmbH BioCampus Cologne, Cologne, Germany) were used.

### RNA labeling and hybridization

For microarray experiments, 1 µg of total RNA from each sample was amplified by a MessageAmp RNA Kit (Ambion, Austin, TX, USA) according to the manufacturer's instructions. RNAs from cells cultured in complete medium were labeled with cyanine-3 (Cy3), and RNAs from cells cultured in starved medium were labeled with Cy5. Three micrograms of each Cy3- and Cy5-labeled amplified RNA (aRNA) were fragmented with Agilent aRNA fragmentation buffer and made up in Agilent hybridization buffer. Labeled aRNAs were then hybridized to a mouse pan-genomic microarray at 60 °C for 17 h. Microarrays were washed and then scanned with an Affymetrix 428 scanner (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) at a resolution of 10 µm using appropriate gains on the photomultiplier to obtain the highest signal without saturation.

### Microarray analysis

The signal and background intensity values for the Cy3 and Cy5 channels from each spot were obtained using IMAGEONE 6.0 (Biodiscovery, El Segundo, CA, USA). Data were filtered using ImageOne 'empty spots' to remove from the analysis genes that were too weakly expressed. After base-2 logarithmic transformation, data were corrected for systematic dye bias by Lowess normalization using GENESIGHT 4.1 software (Biodiscovery) and controlled by *M-A* plot representation. Statistical analyses were performed using free R 2.1 software. The log ratios between the two conditions (with two independent experiments conducted for each cell line) were analyzed using a standard Student's *t*-test to detect differentially expressed genes. *P* values were adjusted using the Bonferroni correction for multiple testing to eliminate false positives. Differences were considered to be significant at adjusted *P* < 0.01 and a cut-off ratio of > 1.8 or < 0.55 to identify genes differentially expressed by amino acid starvation. All the genes given in the figures and Supporting Information (using GCN2<sup>+/+</sup> cells) were regulated with a fold change of greater than ( $\pm$ )1.8 in all independent experiments. The genes that were found to be regulated in only one experiment were not taken into account. This occurred mainly for genes either having an induction ratio close to 1.8 or expressed at a low basal level.

These genes were then classified according to their biological process ontology determined from the QuickGO gene ontology browser [QuickGO GO Browser (online database), European Bioinformatics Institute, available from: <http://www.ebi.ac.uk/ego/>].



## Enrichment rate calculation

To calculate the enrichment rate and to determine the functional interpretation of the data, we analysed the regulated genes with FATIGO software from the Babelomics suite web tool (<http://www.babelomics.org>) [36]. FATIGO software calculates the distribution of GO terms for biological processes between the regulated genes obtained from microarray experiments and the RNG microarray gene lists. The enrichment is computed as the percentage of changed genes divided by the percentage of total genes in the chip in one GO term.

## Analysis of gene expression using quantitative RT-PCR

Real-time quantitative PCR was performed as described previously [37]. Each analysis was normalized with  $\beta$ -actin.

The primers used for quantitative RT-PCR were as listed in Table 3.

**Table 3.** Primers used for quantitative RT-PCR.

	Primer (5'- to 3')
Ddit3 (Chop)	forward, CCTAGCTTGGCTGACAGAGG; reverse, CTGCTCCTTCTCCTTCATGC
Asns	forward, TACAACCACAAGGCGCTACA; reverse, AAGGGCCTGACTCCATAGGT
Trb3	forward, CAGGAAGAACCGTTGGAGTT; reverse, TTGCTCTCGTTCCAAAAGGA
Actb	forward, AAGGAAGGCTGGAAAGAGC reverse, TACAGCTTCACCACCACAGC
Hmgcs1	forward, TTTGATGCAGGTGTTTGAGG reverse, CCACCTGTAGGTCTGGCA
Sqstm1	forward, CCTTGCCCTACAGCTGAGTC reverse, CTTGTCTTCTGTGCCTGTGC
lfrd1	forward, GTTGAATTGGCCAGAGGAA reverse, TCTGTTGGAAATCCCGTTC
Cxcl10	forward, CCCACGTGTTGAGATCATTTG reverse, GAGGAACAGCAGAGAGCCTC
Cxcl10 pre-mRNA	forward, AGCAGAGGAAAATGCACCAG reverse, CACCTGGGTAAAGGGAGTGA
Dusp16	forward, GCTCCGCCACTATTGCTATT reverse, AGGTGCAGCAGCTTCAGTTT
Dusp16 pre-mRNA	forward, CAGTGCTGGAATTGTACGTGA reverse, AGTCCATGAGTTGGCCCATATA
Egr1	forward, CCTATGAGCACCTGACCACA reverse, AGGCCACTGACTAGGCTGAA
Egr1 pre-mRNA	forward, GAGCAGGTCCAGGAACATTG reverse, GGGATAACTCGTCTCCACCA
Ndr1	forward, ACCTGCTACACCCCTCTT reverse, TGCCAATGACACTCTTGAGC
Idi1	forward, GGGCTGACCAAGAAAAC reverse, TCGCCTGGGTACTTAATGG

## Acknowledgements

We thank Dr D. Ron (New York University, NY, USA), for providing us with GCN2<sup>-/-</sup> cells.

## References

- 1 Jackson AA & Grimble MS (1990) *The Malnourished Child*. Raven Press, Vevey.
- 2 Baertl JM, Placko RP & Graham GG (1974) Serum proteins and plasma free amino acids in severe malnutrition. *Am J Clin Nutr* **27**, 733–742.
- 3 Gietzen DW (1993) Neural mechanisms in the responses to amino acid deficiency. *J Nutr* **123**, 610–625.
- 4 Maurin AC, Jousse C, Averous J, Parry L, Bruhat A, Cherasse Y, Zeng H, Zhang Y, Harding HP, Ron D *et al.* (2005) The GCN2 kinase biases feeding behavior to maintain amino acid homeostasis in omnivores. *Cell Metab* **1**, 273–277.
- 5 Hao S, Sharp JW, Ross-Inta CM, McDaniel BJ, Anthony TG, Wek RC, Cavener DR, McGrath BC, Rudell JB, Koehnle TJ *et al.* (2005) Uncharged tRNA and sensing of amino acid deficiency in mammalian piriform cortex. *Science* **307**, 1776–1778.
- 6 Guo F & Cavener DR (2007) The GCN2 eIF2 $\alpha$  kinase regulates fatty-acid homeostasis in the liver during deprivation of an essential amino acid. *Cell Metab* **5**, 103–114.
- 7 Kilberg MS, Pan YX, Chen H & Leung-Pineda V (2005) Nutritional control of gene expression: how mammalian cells respond to amino acid limitation. *Annu Rev Nutr* **25**, 59–85.
- 8 Struhl K (1987) Promoters, activator proteins, and the mechanism of transcriptional initiation in yeast. *Cell* **49**, 295–297.
- 9 Forsberg H & Ljungdahl PO (2001) Sensors of extracellular nutrients in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **40**, 91–109.
- 10 Iraqui I, Vissers S, Andre B & Urrestarazu A (1999) Transcriptional induction by aromatic amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **19**, 3360–3371.
- 11 Hinnebusch AG (1988) Mechanisms of gene regulation in the general control of amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* **52**, 248–273.
- 12 Fernandez J, Yaman II, Mishra R, Merrick WC, Snider MD, Lamers WH & Hatzoglou M (2000) IRES-mediated translation of a mammalian mRNA is regulated by amino acid availability. *J Biol Chem* **275**, 12, 12.
- 13 Yaman I, Fernandez J, Liu H, Caprara M, Komar AA, Koromilas AE, Zhou L, Snider MD, Scheuner D, Kaufman RJ *et al.* (2003) The zipper model of translational control: a small upstream ORF is the switch that controls structural remodeling of an mRNA leader. *Cell* **113**, 519–531.
- 14 Barbosa-Tessmann IP, Chen C, Zhong C, Siu F, Schuster SM, Nick HS & Kilberg MS (2000) Activation of the human asparagine synthetase gene by the amino acid response and the endoplasmic reticulum stress response pathways occurs by common genomic elements. *J Biol Chem* **275**, 26976–26985.

- 15 Bruhat A, Jousse C, Wang XZ, Ron D, Ferrara M & Fafournoux P (1997) Amino acid limitation induces expression of CHOP, a CCAAT/enhancer binding protein-related gene, at both transcriptional and post-transcriptional levels. *J Biol Chem* **272**, 17588–17593.
- 16 Jousse C, Averous J, Bruhat A, Carraro V, Mordier S & Fafournoux P (2004) Amino acids as regulators of gene expression: molecular mechanisms. *Biochem Biophys Res Commun* **313**, 447–452.
- 17 Bruhat A, Jousse C, Carraro V, Reimold AM, Ferrara M & Fafournoux P (2000) Amino acids control mammalian gene transcription: activating transcription factor 2 is essential for the amino acid responsiveness of the CHOP promoter. *Mol Cell Biol* **20**, 7192–7204.
- 18 Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calton M, Sadri N, Yun C, Popko B, Paules R *et al.* (2003) An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell* **11**, 619–633.
- 19 Lu PD, Harding HP & Ron D (2004) Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. *J Cell Biol* **167**, 27–33.
- 20 Vattam KM & Wek RC (2004) Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 11269–11274.
- 21 Averous J, Bruhat A, Jousse C, Carraro V, Thiel G & Fafournoux P (2004) Induction of CHOP expression by amino acid limitation requires both ATF4 expression and ATF2 phosphorylation. *J Biol Chem* **279**, 5288–5297.
- 22 Siu F, Bain PJ, LeBlanc-Chaffin R, Chen H & Kilberg MS (2002) ATF4 is a mediator of the nutrient-sensing response pathway that activates the human asparagine synthetase gene. *J Biol Chem* **277**, 24120–24127.
- 23 Peng T, Golub TR & Sabatini DM (2002) The immunosuppressant rapamycin mimics a starvation-like signal distinct from amino acid and glucose deprivation. *Mol Cell Biol* **22**, 5575–5584.
- 24 Deval C, Talvas J, Chaveroux C, Maurin AC, Mordier S, Cherasse Y, Parry L, Carraro V, Jousse C, Bruhat A *et al.* (2008) Amino-acid limitation induces the GCN2 signaling pathway in myoblasts but not in myotubes. *Biochimie* **90**, 1716–1721.
- 25 Pan YX, Chen H & Kilberg MS (2005) Interaction of RNA-binding proteins HuR and AUF1 with the human ATF3 mRNA 3'-untranslated region regulates its amino acid limitation-induced stabilization. *J Biol Chem* **280**, 34609–34616.
- 26 Yaman I, Fernandez J, Sarkar B, Schneider RJ, Snider MD, Nagy LE & Hatzoglou M (2002) Nutritional control of mRNA stability is mediated by a conserved AU-rich element that binds the cytoplasmic shuttling protein HuR. *J Biol Chem* **277**, 41539–41546.
- 27 Chen H, Pan YX, Dudenhausen EE & Kilberg MS (2004) Amino acid deprivation induces the transcription rate of the human asparagine synthetase gene through a timed program of expression and promoter binding of nutrient-responsive bZIP transcription factors as well as localized histone acetylation. *J Biol Chem* **279**, 50829–50839.
- 28 Lipson KE & Baserga R (1989) Transcriptional activity of the human thymidine kinase gene determined by a method using the polymerase chain reaction and an intron-specific probe. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 9774–9777.
- 29 Karpinski BA, Morle GD, Huggenvik J, Uhler MD & Leiden JM (1992) Molecular cloning of human CREB-2: an ATF/CREB transcription factor that can negatively regulate transcription from the cAMP response element. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 4820–4824.
- 30 Jousse C, Bruhat A, Ferrara M & Fafournoux P (1998) Physiological concentration of amino acids regulates insulin-like-growth-factor-binding protein 1 expression. *Biochem J* **334**, 147–153.
- 31 Averous J, Maurin AC, Bruhat A, Jousse C, Arluguie C & Fafournoux P (2005) Induction of IGFBP-1 expression by amino acid deprivation of HepG2 human hepatoma cells involves both a transcriptional activation and an mRNA stabilization due to its 3'UTR. *FEBS Lett* **579**, 2609–2614.
- 32 Jousse C, Bruhat A, Ferrara M & Fafournoux P (2000) Evidence for multiple signaling pathways in the regulation of gene expression by amino acids in human cell lines. *J Nutr* **130**, 1555–1560.
- 33 Aharon T & Schneider RJ (1993) Selective destabilization of short-lived mRNAs with the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor AU-rich 3' noncoding region is mediated by a cotranslational mechanism. *Mol Cell Biol* **13**, 1971–1980.
- 34 Koeller DM, Horowitz JA, Casey JL, Klausner RD & Harford JB (1991) Translation and the stability of mRNAs encoding the transferrin receptor and c-fos. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 7778–7782.
- 35 Kawai T, Fan J, Mazan-Mamczarz K & Gorospe M (2004) Global mRNA stabilization preferentially linked to translational repression during the endoplasmic reticulum stress response. *Mol Cell Biol* **24**, 6773–6787.
- 36 Al-Shahrour F, Minguez P, Vaquerizas JM, Conde L & Dopazo J (2005) BABELOMICS: a suite of web tools for functional annotation and analysis of groups of genes in high-throughput experiments. *Nucleic Acids Res* **33**, W460–W464.
- 37 Jousse C, Deval C, Maurin AC, Parry L, Cherasse Y, Chaveroux C, Lefloch R, Lenormand P, Bruhat A & Fafournoux P (2007) TRB3 inhibits the transcriptional activation of stress-regulated genes by a negative feedback on the ATF4 pathway. *J Biol Chem* **282**, 15851–15861.

## Supporting information

The following supplementary material is available:

**Table S1.** Regulation of gene expression on amino acid starvation in GCN2+/+ and GCN2-/- MEF cells.

**Table S2.** Regulation of gene expression on rapamycin treatment in MEF cells.

**Table S3.** Genes regulated by both amino acid starvation and rapamycin treatment.

This supplementary material can be found in the online version of this article.

Please note: Wiley-Blackwell is not responsible for the content or functionality of any supplementary materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.



**Amino-acid limitation induces the GCN2 signaling pathway in myoblasts but not in myotubes.**

Deval C, Talvas J, **Chaveroux C**, Maurin AC, Mordier S, Cherasse Y, Parry L, Carraro V, Jousse C, Bruhat A, Fafournoux P.

Biochimie. 2008 Nov-Dec;90(11-12):1716-21.

## Research paper

# Amino-acid limitation induces the GCN2 signaling pathway in myoblasts but not in myotubes

Christiane Deval, Jérémie Talvas, Cédric Chaveroux, Anne-Catherine Maurin, Sylvie Mordier, Yoan Cherasse, Laurent Parry, Valérie Carraro, Céline Jousse, Alain Bruhat, Pierre Fafournoux\*

*Unité de Nutrition Humaine, UMR 1019, INRA de Theix, 63122 Saint Genès Champanelle, France*

Received 6 March 2008; accepted 17 July 2008

Available online 25 July 2008

## Abstract

There is a growing body of evidence that suggests that amino acids play an important role in controlling gene expression, but the cell specificity of the amino-acid-mediated regulation of gene expression in mammals remains unknown. Using a model of muscle cells (C2C12) at two stages of differentiation, i.e. myoblasts and myotubes, we employed transcriptional profiling to show that amino-acid deficiency does not regulate the same set of gene in differentiated and non-differentiated cells. Furthermore, in myotubes, the GCN2 pathway is not activated by amino-acid starvation due to an amino-acid supply from intracellular proteolysis associated with a low GCN2 expression.

© 2008 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

**Keywords:** Amino acid; Gene expression; GCN2; Myotube; Myoblast

## 1. Introduction

All mammalian cells regulate gene expression in response to changes in the external environment, such as nutrient availability. Amino-acid availability can, for example, regulate transcription, translation, and mRNA stability. Investigations at the molecular level have thus far focused only on translational control of CAT-1 expression [1,2] and transcriptional regulation of CHOP [3] and Asparagine Synthetase (ASNS) [4] (see Refs. [5,6] for review). CHOP and ASNS gene transcription is regulated by a *cis*-element located in the promoter of these genes that is known as Amino Acid Response Element (AARE) [4,7]. The signaling pathway responsible for this regulation involves the kinase GCN2, which is activated by free tRNA accumulation during amino-acid starvation [8,9]. Once activated, GCN2 phosphorylates the translation initiation factor eIF2 $\alpha$  (eukaryotic initiation factor 2  $\alpha$ ), thereby

impairing the synthesis of the 43S preinitiation complex and thus strongly inhibiting translation initiation. Under these circumstances, the transcription factor ATF4 is translationally upregulated due to the presence of uORFs in the 5'UTR of its mRNA [10,11]. ATF4 then binds the AARE and induces the expression of target genes [12,13].

One aspect of the amino-acid control of gene expression that is not known in mammals is the cell specificity of this regulation. Indeed, the majority of the mechanistic studies have been performed on non-differentiated cells. The present study addressed the regulation of gene expression by amino-acid limitation in both differentiated and non-differentiated cells. We used a model of muscle cells at two stages of differentiation, i.e. myoblasts and myotubes. We have chosen muscle because this tissue is highly sensitive to circulating amino acids in which they regulate protein synthesis through a pathway that involves GCN2 and mTOR protein kinases [14]. However, the role of the GCN2 kinase in the control of gene expression has not yet been addressed in muscle. We used the C2C12 myoblasts cell line that differentiates rapidly in an adequate medium to form contractile myotubes and

\* Corresponding author. Tel.: +33 4 73 62 45 62; fax: +33 4 73 62 47 55.

E-mail address: [fpierre@clermont.inra.fr](mailto:fpierre@clermont.inra.fr) (P. Fafournoux).

produces characteristic muscle proteins. Our results demonstrate that the GCN2 pathway regulates gene expression in myoblasts. However, GCN2 is not activated by amino-acid starvation in myotubes due to an amino-acid supply from intracellular proteolysis.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Cells cultures and treatment conditions

The C2C12 mouse muscle cell lines were from ATCC. The C2C12 cells were cultured as previously described [15]. For amino-acid starvation experiments, an F12/DMEM without amino acids was used. The medium was supplemented with individual non-essential amino acids at the concentration of the control medium. In all experiments involving amino-acid starvation, dialyzed serum was used.

### 2.2. RNA extraction

Total RNA was prepared using the RNeasy total RNA Mini kit (Qiagen). RNA concentration and integrity were assessed using the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Massy, France). High quality RNAs with A260/A280 ratio over 1.9 and intact ribosomal 28S and 18S bands were utilized for microarray experiments and real-time RT-PCR.

### 2.3. Oligo microarrays

Mouse oligonucleotide microarrays containing 25,000 genes and expressed sequence tags were used to profile change in gene expression of different cultured cells starved with essential amino acids. Microarray chips were obtained from RNG (Réseau National des Génopoles, France).

### 2.4. RNA labeling and hybridization

For microarray experiments, 1 µg of total RNA from each sample was amplified by MessageAmp RNA Kit (Ambion, Austin, TX, USA) according to manufacturer's instructions. RNAs from cells cultured in complete medium were labeled with Cy3, and RNAs from starved medium were labeled with Cy5. Three micrograms of each Cy3 and Cy5-labeled aRNA (amplified RNA) were fragmented with the Agilent aRNA fragmentation buffer and made up in Agilent hybridization buffer. Labeled aRNAs were then hybridized to mouse pan genomic microarrays at 60 °C for 17 h. Microarrays were washed and then scanned with an Affimetrix 428 scanner (Affimetrix, Santa Clara, CA) at 10-µm resolution using appropriate gains on the photomultiplier (PMT) to obtain the highest signal without saturation.

### 2.5. Microarray analysis

The signal and background intensity values for the Cy3 and Cy5 channels of each spot were obtained using Image 6.0 (Biodiscovery). Data were filtered using Image “empty

spots” to remove genes from the analysis that were too weakly expressed. After base-2 log transformation, data were corrected for systematic dye bias by *Lowess* normalization using GeneSight 4.1 software (Biodiscovery) and controlled by *M–A* plot representation. Statistical analyses were performed using free R 2.1 software. The log ratios between the two conditions (with two independent experiments conducted for each cell line) were analyzed with a standard Student's *t* test to detect differentially expressed genes. *P* values were adjusted using the Bonferroni correction for multiple testing to eliminate false positives. Differences were considered significant at adjusted *p* < 0.01 and a cut-off ratio of >1.5 and <0.5 to identify genes differentially expressed by amino-acid starvation. Two independent experiments were performed.

### 2.6. Analysis of gene expression using quantitative RT-PCR

Real-time quantitative PCR was performed as previously described [16]. Each analysis was normalized with beta-Actin or GAPDH mRNA.

Primers used for quantitative RT-PCR: Chop: (forward, 5'-cctagcttggtgacagagg-3'; reverse, 5'-ctgctccttctcctcatgc-3'). Egr1: (forward, 5'-gagttatcccagccaaacga-3'; reverse, 5'-aggcagaggaagacgatgaa-3'). EIF2αk4 (Gcn2): (forward, 5'-aactccgatgacccaacatcg-3'; reverse, 5'-cggtaggccttcccatctat-3'). Gapdh: (forward, 5'-gggattgctctcaatgaca-3'; reverse, 5'-tgtgaggagatgctcagtg-3'). Fbn: (forward, 5'-ccaactgtcccaaacatct-3'; reverse, 5'-aggcttcacaaccaccgttc-3'). Klf4: (forward, 5'-gcagtcacaaagtcctctc-3'; reverse, 5'-ctgtgtgagtcgcaggtgt-3'). Sqstm1: (forward, 5'-ccttgccctacagctgagtc-3'; reverse, 5'-cttgctctctgtgctgtgc-3'). Idi1: (forward, 5'-gggctgacaccaa gaaaaac-3'; reverse, 5'-tcgcctgggtactaatgg-3').

### 2.7. Immunoblot analysis

Protein was extracted in RIPA buffer and western blot were performed as previously published [15]. Phospho-eIF2α (ser51) was from epitomics (Cat#1090-1), eIF2α antibody and GCN2 antibody from Santa Cruz technology (Sc-11386 and SC-46338, respectively).

## 3. Results and discussion

### 3.1. Amino-acid deficiency does not regulate the same set of genes in myoblasts and myotubes

To identify the genes regulated by amino-acid starvation in myoblasts and myotubes, we used a cDNA array-based approach that allows large-scale analysis of gene expression. Labeled probes synthesized from cellular mRNA were hybridized to oligonucleotide microarrays capable of detecting the expression of about 25,000 different mouse genes and Expressed Sequence Tags (ESTs). Myoblasts and myotubes were starved of all the essential amino acids except cysteine and methionine, which were maintained in order to preserve glutathione synthesis and prevent oxidative stress. The

protocol chosen included a 6-h incubation period in order to capture rapid changes in gene expression in response to amino-acid deficiency. Among the genes represented on the microarray, 75% were expressed in myoblasts and 65% in myotubes when the cells were incubated in control medium (a gene is considered as expressed when its expression level is three-fold higher than background).

In myoblasts, 272 genes were regulated by amino-acid starvation: 139 genes were more than 1.8-fold upregulated and 133 genes were more than 1.8-fold downregulated (Fig. 1 and Supplementary data). The biological processes enriched by amino-acid starvation (as assessed by FatiGO software) include response to unfolded protein, translation, amino-acid metabolism, and carboxylic acid metabolic processes (not shown).

In order to confirm the data obtained using microarrays, we measured the expression of four of the genes found to be regulated by amino-acid starvation (Fbn1, Klf4, Sqstm1 and Idl1) using quantitative RT-PCR (qRT-PCR). Fig. 2 shows that the qRT-PCR data were in good agreement with the data presented in Table S1, thus demonstrating the validity of the microarrays experiments.

In myotubes, we identified only 11 genes more than 1.8-fold upregulated and 7 genes more than 1.8-fold downregulated (Table S1). Previous experiments indicated that the regulation of gene expression in response to amino-acid starvation was delayed in myotubes (data not shown). After a longer period of amino-acid starvation (16 h), we found that 15 other genes were upregulated and 17 genes were downregulated (Fig. 1 and Supplementary data). Among the amino-acid-regulated genes in myotubes, 4 were characterized as participating in cytoskeleton organization and biogenesis. It should be underlined that after amino-acid starvation, only 6 genes were upregulated in both myoblasts and myotubes (Tmsb4x, Ppia, Mt1, Tpt1, Ubc and 2900073G15Rik).

These data suggest that myotubes are less responsive to amino-acid starvation than myoblasts. The fact that the GCN2 pathway is the main regulatory mechanism activated by

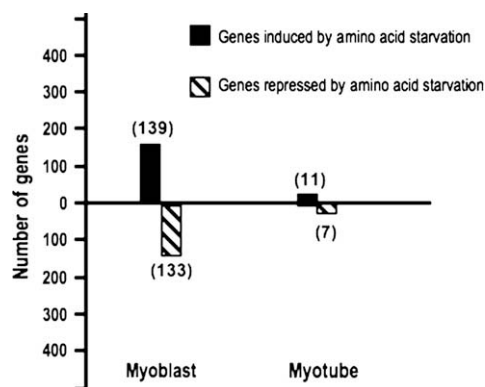


Fig. 1. Global behavior of gene expression upon amino-acid starvation in C2C12 myoblasts and myotubes. Number of genes exhibiting changes in their expression level after 6 h of starvation in essential amino acids except cysteine and methionine. Filled bars: expression level increased more than 1.8-fold; hatched bars: expression level decreased more than 1.8-fold.

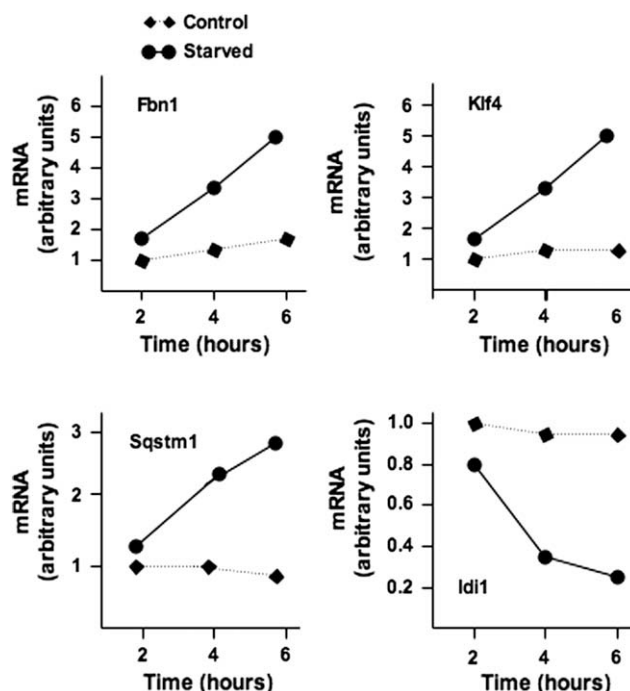


Fig. 2. Induction of several amino-acid-regulated genes by amino-acid starvation in C2C12 myoblasts. Myoblasts cells were incubated either in control medium or in medium starved in essential amino acids except cysteine and methionine. RNA was then extracted and the mRNA content was measured by qRT-PCR.

amino-acid starvation suggested that this pathway may be poorly activated in myotubes. Our results prompted us to study the role of the GCN2 pathway in myoblasts and in myotubes.

### 3.2. The GCN2 pathway is not activated by amino-acid starvation in myotubes

To determine whether the amino-acid-dependent GCN2 pathway is activated in myoblasts and in myotubes, we measured the phosphorylated form of eIF2 $\alpha$ , which is the product of GCN2 activity, in response to amino-acid starvation. Fig. 3A shows that eIF2 $\alpha$  was phosphorylated in response to leucine starvation in myoblasts but not in myotubes. These results show that the GCN2 pathway is not activated by leucine starvation in myotubes.

The simplest hypothesis to explain the lack of eIF2 $\alpha$  phosphorylation would be that GCN2 is expressed at a lower level in myotubes. As shown in Fig. 3B, we measured GCN2 protein and GCN2 mRNA expression levels by western blot and qRT-PCR. Although GCN2 mRNA was expressed at the same level in both cell lines, GCN2 protein expression was weaker in myotubes than myoblasts. However, this difference in expression levels appears to be too small (about 2-fold) to explain the lack of the stimulation of eIF2 $\alpha$  phosphorylation in myotubes upon amino-acid starvation. A second hypothesis could be that the intracellular pool of amino acids in myotubes is not depleted enough by amino-acid starvation to activate GCN2. Indeed, it was shown that during an acute decrease in external amino-acid supply, efficient translation is ensured by

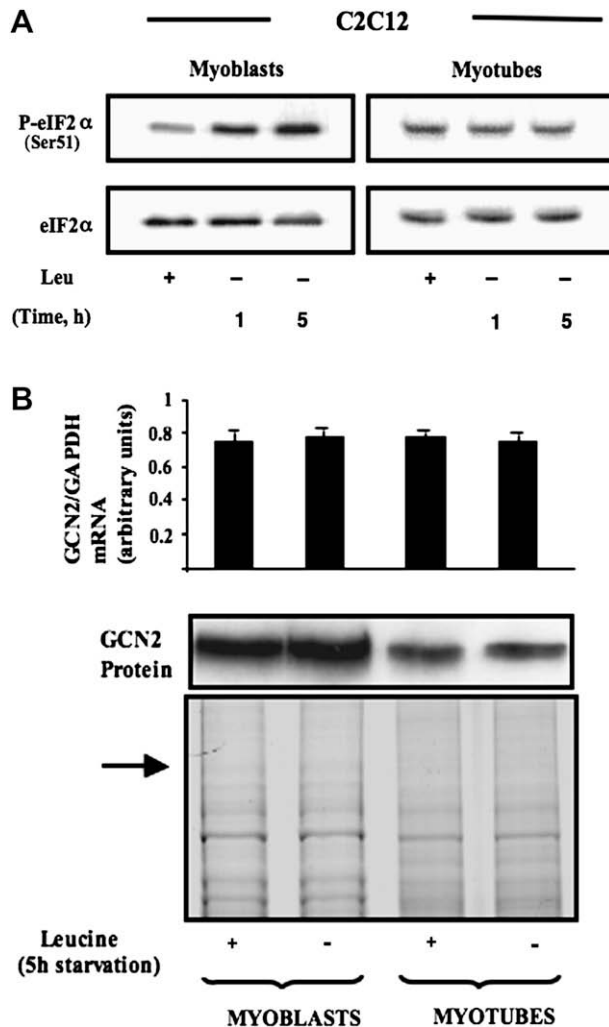


Fig. 3. Activity of the GCN2 pathway in differentiated and non-differentiated C2C12 cells. A: Phosphorylation of eIF2α in response to leucine starvation. Myotube and myoblasts were incubated either in a control medium or in a medium devoid of leucine for the indicated period of time. The content of the total and phosphorylated form of eIF2α was analyzed by western blot using specific antibodies. B: The expression level of GCN2 was measured in both myotubes and myoblasts. The mRNA encoding GCN2 and GAPDH were measured by quantitative RT-PCR. The ratio GCN2/GAPDH is given. The GCN2 protein was quantified by western blot using appropriate antibody. The stained blot is given for normalization. Arrow indicates the molecular weight of GCN2.

proteasomal protein degradation [17]. As myotubes contain large amounts of proteins (contractile proteins) compared to myoblasts, it is reasonable to speculate that, in response to amino-acid starvation, protein hydrolysis could provide enough of the limiting amino acid to prevent GCN2 activation.

### 3.3. In myotubes, amino acid supply from intracellular proteolysis prevents the response to amino-acid starvation

To explore this hypothesis, we measured the activation of the GCN2 pathway by leucine starvation in the presence of proteasome inhibitor MG132. To reflect the activity of the GCN2 pathway, we

measured the expression levels of two genes (Chop and Egr1) upregulated in response to leucine starvation. However, it has been previously shown that MG132 generates a stress of the endoplasmic reticulum (ER) and thus activates the ER-stress pathway [18], which shares common elements with the GCN2 pathway [6]. Therefore, we chose one ER-stress-regulated gene (Chop) and one non-ER stress-regulated gene (Egr1) (data not shown).

As illustrated in Fig. 4, in the absence of MG132, both Chop and Egr1 were induced by leucine starvation in myoblasts but not in myotubes. However, Chop and Egr1 were significantly upregulated by leucine starvation in myotubes when in the presence of MG132 only. These results suggest that in starved myotubes, the proteasomal degradation of pre-existing proteins provides enough amino acids to prevent any regulatory mechanisms.

It should also be highlighted that MG132 increased the baseline levels of CHOP mRNA in both myoblasts and myotubes. It could be speculated that ER stress may be responsible for the effect of MG132 on Chop expression in non-starved cells, since Egr1 expression levels remained unaffected by MG132 in both myoblasts and myotubes.

Taken together, these results suggest that the low GCN2 expression associated with an amino-acid supply from

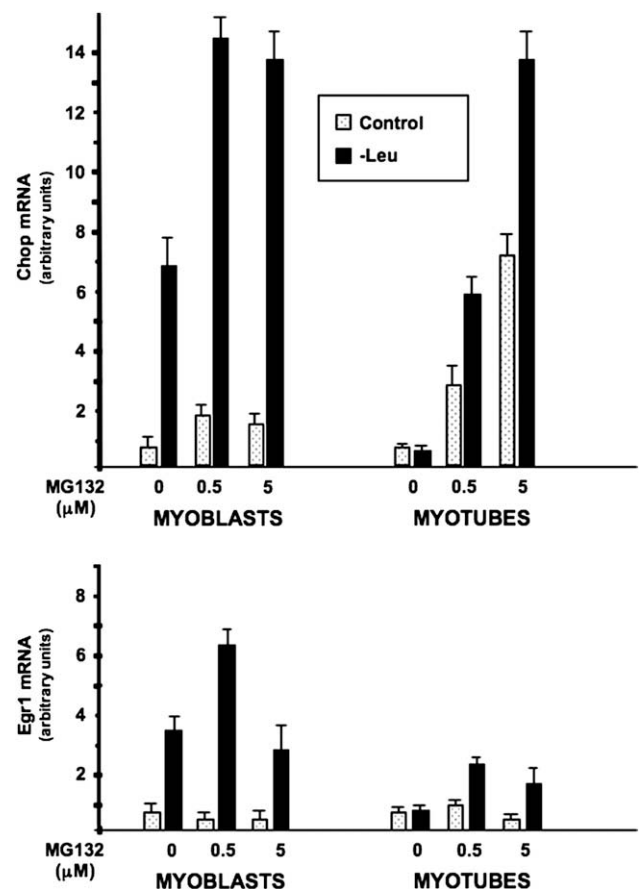


Fig. 4. Effect of proteasome activity on the regulation of Chop and Egr1 by leucine starvation in myoblasts and myotubes. Cells were incubated for 2.5 h either in control medium or in medium lacking leucine (–leu). During the incubation period, MG132 (or vehicle) was added at the indicated concentration. The expression levels of Chop, Egr1 and GAPDH were quantified by qRT-PCR. GAPDH was used for normalization.



intracellular proteolysis could contribute to the weak response of the GCN2 pathway to amino-acid starvation in myotubes. To validate definitively this conclusion, it would have been useful to determine the intracellular amino-acid content under starvation conditions in both myoblasts and myotubes. Unfortunately, it was not technically possible to measure accurately the intracellular amino acids concentration under starved conditions. To circumvent this technical difficulty, we measured the inhibition of protein synthesis in response to amino-acid starvation in both cell lines. Protein synthesis was determined by measuring the incorporation of radioactive methionine as described in Talvas et al. [15]. A 2-h leucine starvation inhibits protein synthesis by 30% in myoblasts and only 13% in myotubes. Since protein synthesis is mainly controlled by the amino-acid concentration, these results suggest that the intracellular amino-acid concentration is higher in myotubes than in myoblasts. These data are in good agreement with the hypothesis that, in response to amino-acid starvation, myotubes are less depleted than myoblasts.

In conclusion, our results show the importance of cellular background in amino-acid-regulated gene expression. The comparison between myoblasts and myotubes revealed that the GCN2 pathway is poorly activated by amino-acid starvation in myotubes. Our results suggest that a low expression of GCN2 associated with amino-acid supply from intracellular proteolysis could contribute to the non-activation of the GCN2 pathway by amino-acid starvation in myotubes. However, we cannot exclude that additional mechanisms such as regulatory partner(s) may be involved in this GCN2 inhibition in myotubes. Recently, the IMPACT protein was described as a GCN2 inhibitor [19]. We measured similar IMPACT mRNA expression levels in both myoblasts and myotubes (data not shown). This result does not favor a regulatory role of the IMPACT protein. Nevertheless, we cannot rule out the existence of regulatory processes through other GCN2 partners or through a post-translational regulation of GCN2 and/or GCN2-associated proteins. For example, in yeast, it has been shown that the TOR pathway inhibits GCN2 via phosphorylation of its Ser577 and thus maintains the repression of GCN4 and its target genes in the presence of an abundant nutrient supply [20], but this kind of mechanism has not to date been demonstrated in mammalian cells. An important challenge for future work would be to understand the mechanisms involved in GCN2 inactivation in certain cell lines such as myotubes.

Furthermore, our results show that few genes continue to be regulated by amino-acid starvation in myotubes despite the fact that GCN2 is not activated. These data suggest that amino acids can regulate gene expression independently of the GCN2 pathway. Further study is needed in order to identify the molecular mechanisms involved in this process.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found in the online version, at [doi:10.1016/j.bioc.2008.07.004](https://doi.org/10.1016/j.bioc.2008.07.004).

## References

- [1] J. Fernandez, I.I. Yaman, R. Mishra, W.C. Merrick, M.D. Snider, W.H. Lamers, M. Hatzoglou, IRES-mediated translation of a mammalian mRNA is regulated by amino acid availability, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 12.
- [2] I. Yaman, J. Fernandez, H. Liu, M. Caprara, A.A. Komar, A.E. Koromilas, L. Zhou, M.D. Snider, D. Scheuner, R.J. Kaufman, M. Hatzoglou, The zipper model of translational control: a small upstream ORF is the switch that controls structural remodeling of an mRNA leader, *Cell* 113 (2003) 519–531.
- [3] A. Bruhat, C. Jousse, X.Z. Wang, D. Ron, M. Ferrara, P. Fafournoux, Amino acid limitation induces expression of CHOP, a CCAAT/enhancer binding protein related gene, at both transcriptional and post-transcriptional levels, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 17588–17593.
- [4] I.P. Barbosa-Tessmann, C. Chen, C. Zhong, F. Siu, S.M. Schuster, H.S. Nick, M.S. Kilberg, Activation of the human asparagine synthetase gene by the amino acid response and the endoplasmic reticulum stress response pathways occurs by common genomic elements, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 26976–26985.
- [5] M.S. Kilberg, Y.X. Pan, H. Chen, V. Leung-Pineda, Nutritional control of gene expression: how mammalian cells respond to amino acid limitation\*, *Annu. Rev. Nutr.* 25 (2005) 59–85.
- [6] C. Jousse, J. Averous, A. Bruhat, V. Carraro, S. Mordier, P. Fafournoux, Amino acids as regulators of gene expression: molecular mechanisms, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313 (2004) 447–452.
- [7] A. Bruhat, C. Jousse, V. Carraro, A.M. Reimold, M. Ferrara, P. Fafournoux, Amino acids control mammalian gene transcription: activating transcription factor 2 is essential for the amino acid responsiveness of the CHOP promoter, *Mol. Cell. Biol.* 20 (2000) 7192–7204.
- [8] H.P. Harding, Y. Zhang, H. Zeng, I. Novoa, P.D. Lu, M. Calfon, N. Sadri, C. Yun, B. Popko, R. Paules, D.F. Stojdl, J.C. Bell, T. Hettmann, J.M. Leiden, D. Ron, An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress, *Mol. Cells* 11 (2003) 619–633.
- [9] A. Bruhat, J. Averous, V. Carraro, C. Zhong, A.M. Reimold, M.S. Kilberg, P. Fafournoux, Differences in the molecular mechanisms involved in the transcriptional activation of chop and asparagine synthetase in response to amino acid deprivation or activation of the unfolded protein response, *J. Biol. Chem.* 275 (2002) 25.
- [10] P.D. Lu, H.P. Harding, D. Ron, Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response, *J. Cell Biol.* 167 (2004) 27–33.
- [11] K.M. Vattam, R.C. Wek, Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (2004) 11269–11274.
- [12] J. Averous, A. Bruhat, C. Jousse, V. Carraro, G. Thiel, P. Fafournoux, Induction of CHOP expression by amino acid limitation requires both ATF4 expression and ATF2 phosphorylation, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 5288–5297.
- [13] F. Siu, P.J. Bain, R. LeBlanc-Chaffin, H. Chen, M.S. Kilberg, ATF4 is a mediator of the nutrient-sensing response pathway that activates the human asparagine synthetase gene, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 24120–24127.
- [14] T.G. Anthony, B.J. McDaniel, R.L. Byerley, B.C. McGrath, D.R. Cavener, M.A. McNurlan, R.C. Wek, Preservation of liver protein synthesis during dietary leucine deprivation occurs at the expense of skeletal muscle mass in mice deleted for eIF2 kinase GCN2, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 36553–36561.
- [15] J. Talvas, A. Obled, P. Fafournoux, S. Mordier, Regulation of protein synthesis by leucine starvation involves distinct mechanisms in mouse C2C12 myoblasts and myotubes, *J. Nutr.* 136 (2006) 1466–1471.
- [16] C. Jousse, C. Deval, A.C. Maurin, L. Parry, Y. Cherasse, C. Chaveroux, R. Lefloch, P. Lenormand, A. Bruhat, P. Fafournoux, TRB3 inhibits the transcriptional activation of stress-regulated genes by a negative feedback on the ATF4 pathway, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 15851–15861.

- [17] R.M. Vabulas, F.U. Hartl, Protein synthesis upon acute nutrient restriction relies on proteasome function, *Science* (New York, N.Y.) 310 (2005) 1960–1963.
- [18] H.Y. Jiang, R.C. Wek, Phosphorylation of the alpha-subunit of the eukaryotic initiation factor-2 (eIF2alpha) reduces protein synthesis and enhances apoptosis in response to proteasome inhibition, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 14189–14202.
- [19] C.M. Pereira, E. Sattlegger, H.Y. Jiang, B.M. Longo, C.B. Jaqueta, A.G. Hinnebusch, R.C. Wek, L.E. Mello, B.A. Castilho, IMPACT, a protein preferentially expressed in the mouse brain, binds GCN1 and inhibits GCN2 activation, *J. Biol. Chem.* (2005).
- [20] V.A. Cherkasova, A.G. Hinnebusch, Translational control by TOR and TAP42 through dephosphorylation of eIF2alpha kinase GCN2, *Genes Dev.* 17 (2003) 859–872.

## **Role of the repressor JDP2 in the amino acid-regulated transcription of CHOP.**

Chérasse Y, **Chaveroux C**, Jousse C, Maurin AC, Carraro V, Parry L, Fafournoux P, Bruhat A.

FEBS Lett. 2008 Apr 30;582(10):1537-41.



# Role of the repressor JDP2 in the amino acid-regulated transcription of *CHOP*

Yoan Chérasse, Cédric Chaveroux, Céline Jousse, Anne-Catherine Maurin, Valérie Carraro, Laurent Parry, Pierre Fafournoux\*, Alain Bruhat\*

UMR 1019 of Human Nutrition, INRA de Theix, 63122 Saint Genès Champanelle, France

Received 13 February 2008; revised 25 March 2008; accepted 25 March 2008

Available online 7 April 2008

Edited by Ivan Sadowski

**Abstract** The transcriptional activation of *CHOP* (C/EBP-homologous protein) by amino acid deprivation involves ATF2 and ATF4 binding at the amino acid response element within the promoter. In this report, we investigate the role of JDP2 (Jun Dimerization Protein 2) in the amino acid control of *CHOP* transcription following amino acid starvation. Our results show that JDP2 binds to the *CHOP* AARE in unstimulated cells and that its binding decreases following amino acid starvation. We demonstrate that JDP2 acts as a repressor and suggest that it could be functionally associated with HDAC3 to inhibit *CHOP* transcription.

© 2008 Published by Elsevier B.V. on behalf of the Federation of European Biochemical Societies.

**Keywords:** JDP2; Amino acid response element; ATF2; *CHOP*

## 1. Introduction

In mammals, plasma concentrations of amino acids are markedly affected by dietary or pathological conditions [1]. The amino acids are not only serving their role as metabolic or protein synthetic precursors, but also as signal molecules that reflect the nutritional status of the entire organism. One of the many consequences of this amino acid-dependent signal transduction, termed the amino acid response (AAR) pathway, is a change in the transcription activity for specific genes [2]. At the molecular level, most of the results have been obtained studying the transcriptional regulation of *Asparagine synthetase* (*ASNS*) and *C/EBP homologous protein* (*CHOP*) gene expression in response to amino acid deprivation.

We have investigated amino acid-regulated transcription from the human *CHOP* gene [3]. An amino acid response element (AARE) is essential for the induction of *CHOP* transcription by amino acid starvation and functions as an

enhancer element [4]. The 9 bp core sequence of the *CHOP* AARE (5'-ATTGCATCA-3') differs by 2 bp from the AARE within the *ASNS* gene [5]. Binding studies in vitro and in vivo have revealed ATF2 and ATF4 bindings at the *CHOP* AARE [4,6]. The expression of these factors was shown to be essential for the transcriptional activation of *CHOP* by leucine starvation [4,7]. While it is well established that ATF4 is a master regulator of a number of amino acid-regulated gene transcription, we have recently demonstrated that ATF2 is involved in promoting the modification of the chromatin structure to enhance *CHOP* transcription [6].

It is now established that a multiprotein complex is bound to the *CHOP* AARE including a number of regulatory proteins such as ATF4, C/EBP $\beta$ , TRB3, PCAF and ATF2 [8]. In a previous study, Jin et al. reported the identification of Jun dimerization protein 2 (JDP2) as an interacting partner of ATF2 [9]. JDP2 was initially identified on the basis of its ability to interact specifically with c-Jun [10]. This basic leucine zipper (bZIP) protein can dimerize with itself or with c-Jun, JunB, JunD or ATF2 thereby inhibiting transactivation by Jun, ATF2, and C/EBP $\gamma$  [9]. JDP2 is considered as an AP1 repressor protein and was reported to repress ATF2-mediated transcription by recruiting histone deacetylase HDAC3 complex to the promoter of the target gene [11]. JDP2 is involved in a variety of transcriptional responses that are associated with AP-1 such as UV-induced apoptosis [12], cell differentiation [13] and tumorigenesis [14].

In the context of gene regulation by amino acid starvation, the role of JDP2 remains to be demonstrated. In this report, we show that JDP2 binds to the *CHOP* AARE in the control medium and that its binding decreases following amino acid starvation. We also demonstrate that JDP2 acts as a repressor to inhibit the amino acid regulation of *CHOP* and suggest that JDP2 could be functionally associated with HDAC3 to repress *CHOP* transcription.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plasmids

2X-*CHOP*-AARE-TK-LUC plasmid was generated as previously described [4]. The expression plasmids for JDP2, C2-ATF2 and ATF4 were generously provided by A. Aronheim (Rappaport Institute, Haifa, Israel), G. Thiel (Department of Medical Biochemistry and Molecular Biology, Hombourg, Germany) and J.M. Mesnard (Laboratoire Infections Retrovirales et Signalisation Cellulaire, Montpellier, France). pBluescript (pBS)-ATF2 was a gift of W. Breitwieser (Paterson Institute for Cancer Research, Manchester, UK).

\*Corresponding authors. Fax: +33 4 73 62 47 55 (A. Bruhat, P. Fafournoux).

E-mail addresses: fpierre@clermont.inra.fr (P. Fafournoux), bruhat@clermont.inra.fr (A. Bruhat).

**Abbreviations:** AARE, amino acid response element; ASNS, asparagine synthetase; ATF, activating transcription factor; bZIP, basic leucine zipper; ChIP, chromatin immunoprecipitation; CHOP, C/EBP homologous protein; JDP2, Jun dimerization protein 2; LUC, luciferase; TSA, trichostatin A

## 2.2. Cell culture and treatment conditions

HeLa cells were cultured at 37 °C in Dulbecco's modified Eagle's medium F12 (DMEM F12) (Sigma) containing 10% fetal-bovine serum. When indicated, DMEM F12 lacking leucine was used. In all experiments involving amino acid starvation, 10% dialyzed calf serum was used. ATF2 mutant mice were kindly given by W. Breitwieser (Paterson Institute for Cancer Research) [15].

## 2.3. Transient transfection and luciferase assay

Cells were plated in 12 well-dishes and transfected by the calcium phosphate coprecipitation method as described previously [4]. One microgram of luciferase plasmid was transfected into the cells along with 0.05 µg of pCMV-βGal, a plasmid carrying the bacterial β-galactosidase gene fused to the human cytomegalovirus immediate-early enhancer/promoter region, as an internal control. Relative luciferase activity was given as the ratio of relative luciferase unit/relative β-Gal unit. All values are the means calculated from the results of at least three independent experiments performed in triplicate.

## 2.4. Antibodies

The following antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA): ATF2 (sc-187), ATF4 (sc-200), HDAC3 (sc-1147). Anti-phospho-ATF2 (catalog no. 9221) was obtained from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). The HDAC1 (AM-0131) and HDAC2 (AM-0132) antibodies were from LP BIO (Lake Placid, NY). The JDP2 antibody was given by A. Aronheim (Rappaport Institute) [10].

## 2.5. SiRNA preparation and transfection

SiRNA corresponding to JDP2 mRNA (103019149 #) and to control (1027280 #) were from Qiagen. Transfection and experiments were performed as described previously [8].

## 2.6. Analysis of gene expression using real time RT-PCR

Total RNA was prepared using a RNeasy mini kit (Qiagen). cDNA was synthesized as described previously. PCR was carried out using a LightCycler™ System (Roche) as described previously [6]. Each experiment was repeated three times to confirm the reproducibility of the results. Primers for human *CHOP* sequences: forward primer, 5'-cagaaccagcagaggtcaca-3'; reverse primer, 5'-agctgtgccacttctcttc-3'. To normalize for mRNA content, human β-actin mRNA was also amplified with forward (5'-ggacttcgagcaagagatgg-3') and reverse primers (5'-agcactgtgttgctgacag-3'). Relative results were displayed in nanograms of target gene per 100 ng of β-actin.

## 2.7. Gel mobility shift assays

A double-stranded DNA oligonucleotide containing the wild-type *CHOP* AARE (5'-aacattgcatacatccccc-3') was radiolabelled using T4 polynucleotide kinase (Promega). In vitro transcription/translation of pcDNA-JDP2, pBS-ATF2 and pCI-ATF4 was performed using the TNT T7-coupled reticulocyte lysate system (Promega) according to the manufacturer's instructions. The in vitro translated proteins (100 ng each) in various combinations were incubated in the binding buffer (25 mM HEPES pH 7.9, 60 mM KCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA, 0.75 mM DTT, 1 mM PMSF, 5% glycerol and 1 µg of poly(dI – dC)) for 10 min on ice. Fifty femtomoles of end-labelled DNA oligonucleotide were then added and incubated for a further 10 min. To test the effect of specific antibodies, 1 µl of antiserum (JDP2) or 5 µg (ATF2 or ATF4) of antibody were added to the incubation mixture on ice 1 h prior to the addition of the labelled probe. The samples were loaded on a 4% non-denaturing polyacrylamide gel in 1 × TGE buffer and the radioactive bands were visualized by using a Phosphor-Imager and IMAGEQUANT software (Molecular Dynamics) as described elsewhere [4].

## 2.8. Chromatin immunoprecipitation analysis (ChIP)

ChIP analysis was performed as described previously [6]. Real-time quantitative PCR was performed by using a LightCycler (Roche) and a SYBR-Green-I-containing PCR mix (Qiagen), following the recommendations of the manufacturer. Primers used for human sequences: *hCHOP* amplicon A, 5'-gcagctaaccaagacctg-3' and 5'-ggaggcaacttgacacaaag-3'; *hCHOP* amplicon B (AARE), 5'-aagaggtctcagaccgacta-3' and 5'-atgatgcaatgtttggcaac-3'; *hCHOP* amplicon C, 5'-

agtgcacggagaaagctaa-3' and 5'-ccatacagcagcctgagtga-3'. Primers used for mouse sequences: *mCHOP* AARE, 5'-gggcagacaagttcaggaag-3' and 5'-atgatgcaatgtttggcaac-3'. The PCR reactions were performed as described previously [6]. The results are expressed as the percentage of antibody binding versus the amount of PCR product obtained using a standardized aliquot of input chromatin. Samples are the means from at least three independent immunoprecipitations.

## 3. Results and discussion

### 3.1. The JDP2 binding to *CHOP* AARE decreases in response to leucine starvation

To further determine whether JDP2 could be involved in the repression of the amino acid-induced transcription of *CHOP*, we first investigated the in vivo binding of JDP2 to the *CHOP* AARE. ChIP assays were performed with primer sets covering either the 5' region (amplicon A), the AARE (amplicon B) or the first intron (amplicon C) of the *CHOP* gene (Fig. 1A). The results show that the recruitment of JDP2 to the AARE observed in the control medium decreased after 1 h of leucine deprivation (Fig. 1B). As previously shown, ATF4 binding and phosphorylation of ATF2 were increased on the *CHOP* AARE [6]. Binding of JDP2 was not detected in the 5' region or in the first intron of *CHOP*, confirming that this factor is specifically engaged on the AARE.

Kinetic analysis of JDP2 removal on the *CHOP* AARE in response to amino acid starvation showed that JDP2 recruitment dropped rapidly within 30 min–1 h of leucine removal (Fig. 2). JDP2 reached a minimum level of binding within 1 h of amino acid removal and increased slightly at 4 h. It is noticeable that the decrease in binding of JDP2 closely correlated with the increase in phosphorylation of ATF2 on Thr 71. The decrease in JDP2 binding might be explained either by a post-translational modification or by a decrease in JDP2 expression level. Unfortunately, we were not able to dis-

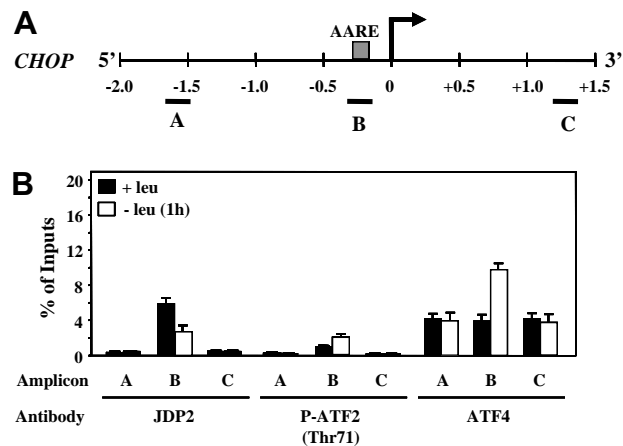


Fig. 1. Decrease in the JDP2 binding to *CHOP* AARE in response to leucine starvation. (A) Scheme of the human *CHOP* gene indicating the different amplicons produced for the ChIP analysis: A (–1678 to –1478), B (–472 to –301) and C (+1163 to +1372). The AARE is boxed in grey. (B) HeLa cells were incubated 1 h either in control (+leu) or leucine-free medium (–leu) and harvested. ChIP analysis was performed as described under Section 2 using antibodies specific for JDP2 (1 µl of antiserum), phospho-ATF2 (Thr-71) and ATF4 (5 µg) and different sets of primers to produce amplicon A, B or C.

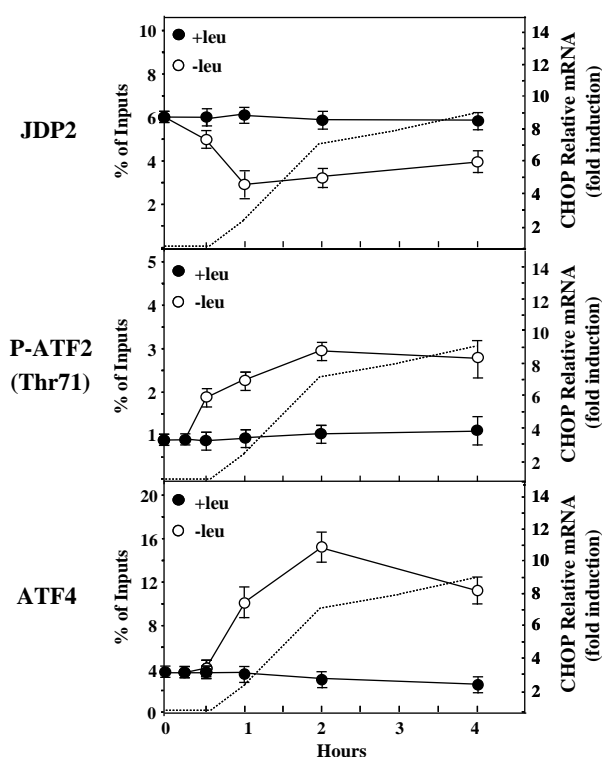


Fig. 2. Time course of JDP2 and ATF4 binding and phosphorylation of ATF2 during leucine starvation. HeLa cells were incubated either in control (+leu) or leucine-free medium (–leu) and harvested for 0–4 h. ChIP analysis was performed as described under Section 2 using antibodies specific for ATF4, phospho-ATF2 (Thr-71) and JDP2 and a set of primers to amplify amplicon B (see Fig. 1A). The dotted line represents the increase in *CHOP* mRNA induction level.

criminate between these two hypothesis. Indeed, all of the JDP2 antibodies available were tested and none of them were able to detect the endogenous protein in HeLa cells by immunoblot analysis. Also, by plotting the *CHOP* mRNA content on the same graph, it is apparent that the fall of JDP2 engagement correlates with the increase in *CHOP* mRNA suggesting that JDP2 could be involved in the repression of *CHOP* transcription in complete medium.

### 3.2. JDP2 binds *CHOP* AARE as a homodimer or heterodimer with ATF2

JDP2 was previously shown to bind directly to its DNA target as a dimer and to interact with ATF2 [9]. To determine whether JDP2 binds directly the *CHOP* AARE, we performed gel mobility shift assays with *in vitro* translated proteins (Fig. 3A). Supershifts with antibodies were used to confirm the specificity of the complexes. Each homodimer of *in vitro* translated ATF2 or JDP2 bound to *CHOP* AARE (lanes 2 and 4). The JDP2 also formed a heterodimer with ATF2 in the presence of the AARE probe, with a molecular weight different from that attributed to the ATF2 or JDP2 homodimer (lane 6). To investigate the role of ATF2 in the JDP2 binding to the *CHOP* AARE, ChIP experiments were performed in MEFs deficient in ATF2 and in the corresponding wild-type cells (Fig. 3B). The ChIP results obtained with wild-type MEFs are consistent with those described above with HeLa cells (see Fig. 1). In ATF2-deficient cells, no ATF2 or phosphorylated ATF2 bound to the AARE is detected. However,

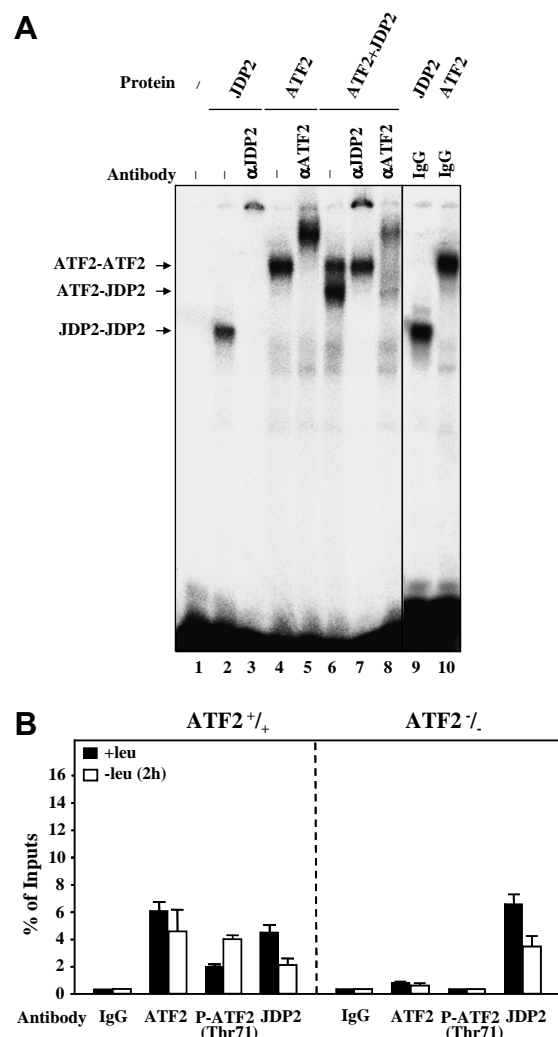


Fig. 3. Direct binding of JDP2 to *CHOP* AARE and dimerization with ATF2. (A) Gel mobility shift assays were carried out by incubating a 19 bp *CHOP* AARE radiolabeled probe with *in vitro* translated proteins and antibodies. The migration positions of the ATF2/ATF2 homodimer, ATF2/JDP2 heterodimer and JDP2/JDP2 homodimer are indicated. (B) ATF2<sup>+/+</sup> and ATF2<sup>-/-</sup> MEFs were incubated 2 h either in control (+leu) or leucine-free medium (–leu) and harvested. ChIP analysis was performed as described under Section 2 using antibodies specific for ATF2, phospho-ATF2 (Thr-71) and JDP2 and a set of primers to produce amplicon B (see Fig. 1A).

the decrease in JDP2 binding remains. Therefore, although in fed cells ATF2 and JDP2 bind at the same time on the *CHOP* AARE, ATF2 is not essential for JDP2 binding.

### 3.3. JDP2 suppresses the amino acid-dependent transcription of *CHOP*

To analyse the effects of JDP2 on the AARE-dependent transcription, HeLa cells were cotransfected with a luciferase (LUC) reporter driven by two copies of the *CHOP* AARE and with either a vector that constitutively express JDP2 or the corresponding empty vector. The response to leucine was determined by LUC assays in starved and non-starved conditions (Fig. 4A). Transient expression of JDP2 repressed the luciferase activity that was mediated by the AARE-TK promoter in both control or leucine-free medium and the effect of JDP2 was dose dependent.

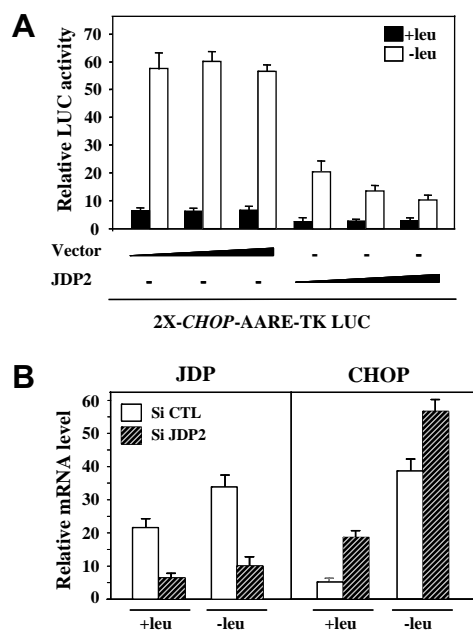


Fig. 4. Effect of JDP2 over-expression or JDP2 knockdown on the amino acid regulation of *CHOP* expression. (A) Effect of JDP2 over-expression. HeLa cells were transiently transfected with 2X-*CHOP*-AARE-TK-LUC (1  $\mu$ g) and increasing amounts (0.25, 0.5, 1  $\mu$ g) of the expression vector for JDP2 or of the empty vector, as indicated. Twenty-four hours after transfection, cells were incubated for 16 h in control (+leu) or in medium lacking leucine (–leu) and assayed for LUC activity. (B) Effect of JDP2 knockdown. HeLa cells were transfected with 60 pmol of JDP2 siRNA or of control siRNA. Two days after siRNA transfection, cells were incubated for 2 h in control (+leu) or in medium lacking leucine (–leu) and then harvested to extract RNA.

To assess the role of JDP2 in the amino acid regulation of *CHOP*, we measured the effect of leucine starvation on *CHOP* mRNA content in JDP2-deficient cells. We employed small interfering double stranded RNA (siRNA) transfection to specifically inhibit the endogenous expression of JDP2. Fig. 4B shows that JDP2-siRNA transfection, while reducing the mRNA content of JDP2, significantly increased the level of *CHOP* mRNA in both presence and absence of leucine when compared to control siRNA-transfected cells. Therefore, altogether these results indicate that JDP2 acts as a repressor to inhibit the amino acid regulation of *CHOP*.

### 3.4. JDP2 inhibits *CHOP* transcription in an HDAC-dependent manner

In a previous study, Jin et al. showed that JDP2 is physically and functionally associated with the histone deacetylase 3 (HDAC3) complex [11]. To first determine whether JDP2 can repress *CHOP* transcription by recruiting an HDAC activity to the *CHOP* AARE, we cotransfected HeLa cells with a LUC reporter driven by two copies of the *CHOP* AARE and a variety of plasmids. Then, we monitored the AARE-mediated reporter activity in the presence or absence of trichostatin A (TSA), an inhibitor of HDACs. The addition of JDP2 suppressed the promoter activity of the AARE-TK-LUC reporter gene that was mediated by C2-ATF2, the constitutively active mutant of ATF2 [16], or ATF4 in the absence of TSA (Fig. 5A). This suppression of transcription of the AARE-TK-LUC reporter gene by JDP2 was, however, clearly

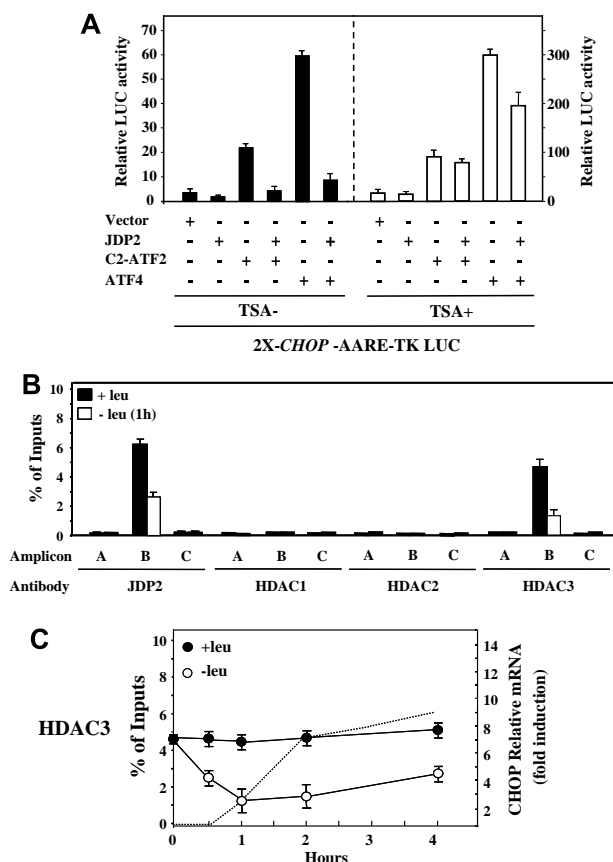


Fig. 5. Decrease in the HDAC3 binding to *CHOP* AARE in response to leucine starvation. (A) Treatment with TSA reverses repression by JDP2. HeLa cells were transiently transfected with 2X-*CHOP*-AARE-TK-LUC (1  $\mu$ g) in the presence or absence of expression plasmids for JDP2, C2-ATF2, ATF4 (0.5  $\mu$ g each) or the empty vector, as indicated. At 8 h after transfection, cells were incubated without or with TSA (100 ng/ml) for 16 h and assayed for LUC activity. (B) HeLa cells were incubated 1 h either in control (+leu) or leucine-free medium (–leu) and harvested. ChIP analysis was performed using antibodies specific for JDP2, HDAC1, HDAC2 and HDAC3 and different sets of primers to produce amplicon A, B or C (see Fig. 1A). (C) HeLa cells were incubated either in control (+leu) or leucine-free medium (–leu) and harvested for 0–4 h. ChIP analysis was performed using an antibody specific for HDAC3 and a set of primers to amplify amplicon B (see Fig. 1A).

reversed upon incubation of the cells with TSA. These data suggest that HDAC activity might be required for the repression of the AARE-dependent transcription induced by JDP2.

To determine whether HDAC3 could also be associated with JDP2 to repress the *CHOP* AARE-dependent transcription, we investigate the in vivo binding of HDAC3 and two other members of the HDAC class I, HDAC1 and HDAC2. The ChIP results show that only HDAC3 is engaged on the AARE in the presence of leucine and its recruitment decreased after 1 h of leucine deprivation (Fig. 5B). Kinetic analysis of HDAC3 removal on the *CHOP* AARE following amino acid starvation closely paralleled those described above for JDP2 (Fig. 5C). Taken together these data suggest that JDP2 bound to the *CHOP* AARE could be functionally associated with HDAC3 and then could contribute to *CHOP* silencing.

In conclusion, the data reported in the present study yield several novel findings regarding the role of JDP2 in the amino



acid-regulated transcription of *CHOP*: (i) we provide evidence that JDP2 binds to the *CHOP* AARE in non-starved condition and that its binding decreases following amino acid starvation, (ii) we demonstrate that JDP2 acts as a repressor of *CHOP* transcription, (iii) we suggest that JDP2 could be functionally associated with HDAC3. In a recent study, Jin et al. have provided evidence that JDP2 regulates gene expression via direct control of the modification of histones and the assembly of chromatin [17]. We proposed that in fed cells, the ability of JDP2 bound to the AARE to recruit HDAC3 could contribute to the silencing of *CHOP* transcription via the maintenance of the hypoacetylation status of histones. However, the mechanism by which amino acid starvation leads to a decrease in JDP2 binding merits further investigation. In starved cells, we have recently reported that phosphorylation of ATF2 at the *CHOP* AARE occurs prior to ATF4 binding, histone acetylation, and increase in *CHOP* mRNA [6]. Although, ATF2 phosphorylation and decrease in JDP2 binding to *CHOP* AARE are two early molecular events involved in the induction of *CHOP* transcription upon amino acid starvation, the cause and effects relationships have to be demonstrated. Taken together, these results demonstrate that following amino acid starvation there is a highly coordinated time-dependent program of interaction between a precise set of bZIP transcription factors and the AARE leading to transcriptional activation of *CHOP*.

**Acknowledgements:** We thank A. Aronheim for the anti-JDP2 serum and for help and discussions; W. Breitwieser for the gift of ATF2 mutant mice; G. Thiel for the gift of the constitutive mutant of ATF2 and K. Yokoyama for discussions. This work was supported by Grants from the Institut National de la Recherche Agronomique and the Région Auvergne.

## References

- [1] Young, V.R., El-Khoury, A.E., Melchor, S. and Castillo, L. (1994) The Biochemistry and Physiology of Protein and Amino Acid Metabolism, With Reference to Protein Nutrition (Niels, C.R.R., Ed.), Protein Metabolism During Infancy, Vol. 33, pp. 1–28, Nestec Ltd., Vevey/ Raven Press Ltd., New York.
- [2] Kilberg, M.S., Pan, Y.X., Chen, H. and Leung-Pineda, V. (2005) Nutritional control of gene expression: how mammalian cells respond to amino acid limitation. *Annu. Rev. Nutr.* 25, 59–85.
- [3] Ron, D. and Habener, J.F. (1992) CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes Dev.* 6, 439–453.
- [4] Bruhat, A., Jousse, C., Carraro, V., Reimold, A.M., Ferrara, M. and Fafournoux, P. (2000) Amino acids control mammalian gene transcription: activating transcription factor 2 is essential for the amino acid responsiveness of the *CHOP* promoter. *Mol. Cell Biol.* 20, 7192–7204.
- [5] Bruhat, A., Averous, J., Carraro, V., Zhong, C., Reimold, A.M., Kilberg, M.S. and Fafournoux, P. (2002) Differences in the molecular mechanisms involved in the transcriptional activation of the *CHOP* and asparagine synthetase genes in response to amino acid deprivation or activation of the unfolded protein response. *J. Biol. Chem.* 277, 48107–48114.
- [6] Bruhat, A., Chérasse, Y., Maurin, A.C., Breitwieser, W., Parry, L., Deval, C., Jones, N., Jousse, C. and Fafournoux, P. (2007) ATF2 is required for amino acid-regulated transcription by orchestrating specific histone acetylation. *Nucleic Acids Res.* 35, 1312–1321.
- [7] Averous, J., Bruhat, A., Jousse, C., Carraro, V., Thiel, G. and Fafournoux, P. (2004) Induction of *CHOP* expression by amino acid limitation requires both ATF4 expression and ATF2 phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 279, 5288–5297.
- [8] Chérasse, Y., Maurin, A.C., Chaveroux, C., Jousse, C., Carraro, V., Parry, L., Deval, C., Chambon, C., Fafournoux, P. and Bruhat, A. (2007) The p300/CBP-associated factor (PCAF) is a cofactor of ATF4 for amino acid-regulated transcription of *CHOP*. *Nucleic Acids Res.* 35, 5954–5965.
- [9] Jin, C., Ugai, H., Song, J., Murata, T., Nili, F., Sun, K., Horikoshi, M. and Yokoyama, K.K. (2001) Identification of mouse Jun dimerization protein 2 as a novel repressor of ATF-2. *FEBS Lett.* 489, 34–41.
- [10] Aronheim, A., Zandi, E., Hennemann, H., Elledge, S.J. and Karin, M. (1997) Isolation of an AP-1 repressor by a novel method for detecting protein–protein interactions. *Mol. Cell Biol.* 17, 3094–3102.
- [11] Jin, C., Li, H., Murata, T., Sun, K., Horikoshi, M., Chiu, R. and Yokoyama, K.K. (2002) JDP2, a repressor of AP-1, recruits a histone deacetylase 3 complex to inhibit the retinoic acid-induced differentiation of F9 cells. *Mol. Cell Biol.* 22, 4815–4826.
- [12] Lerdrup, M., Holmberg, C., Dietrich, N., Shaulian, E., Herdegen, T., Jaattela, M. and Kallunki, T. (2005) Depletion of the AP-1 repressor JDP2 induces cell death similar to apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1745, 29–37.
- [13] Nakade, K., Pan, J., Yoshiki, A., Ugai, H., Kimura, M., Liu, B., Li, H., Obata, Y., Iwama, M., Itohara, S., Murata, T. and Yokoyama, K.K. (2007) JDP2 suppresses adipocyte differentiation by regulating histone acetylation. *Cell Death Differ.* 14, 1398–1405.
- [14] Heinrich, R., Livne, E., Ben-Izhak, O. and Aronheim, A. (2004) The c-Jun dimerization protein 2 inhibits cell transformation and acts as a tumor suppressor gene. *J. Biol. Chem.* 279, 5708–5715.
- [15] Breitwieser, W., Lyons, S., Flenniken, A.M., Ashton, G., Bruder, G., Willington, M., Lacaud, G., Kouskoff, V. and Jones, N. (2007) Feedback regulation of p38 activity via ATF2 is essential for survival of embryonic liver cells. *Genes Dev.* 21, 2069–2082.
- [16] Steinmuller, L. and Thiel, G. (2003) Regulation of gene transcription by a constitutively active mutant of activating transcription factor 2 (ATF2). *Biol. Chem.* 384, 667–672.
- [17] Jin, C., Kato, K., Chimura, T., Yamasaki, T., Nakade, K., Murata, T., Li, H., Pan, J., Zhao, M., Sun, K., Chiu, R., Ito, T., Nagata, K., Horikoshi, M. and Yokoyama, K.K. (2006) Regulation of histone acetylation and nucleosome assembly by transcription factor JDP2. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 331–338.

**The p300/CBP-associated factor (PCAF) is a cofactor of ATF4 for amino acid-regulated transcription of CHOP.**

Chérasse Y, Maurin AC, **Chaveroux C**, Jousse C, Carraro V, Parry L, Deval C, Chambon C, Fafournoux P, Bruhat A.

Nucleic Acids Res. 2007;35(17):5954-65

# The p300/CBP-associated factor (PCAF) is a cofactor of ATF4 for amino acid-regulated transcription of *CHOP*

Yoan Chérasse<sup>1</sup>, Anne-Catherine Maurin<sup>1</sup>, Cédric Chaveroux<sup>1</sup>, Céline Jousse<sup>1</sup>,  
Valérie Carraro<sup>1</sup>, Laurent Parry<sup>1</sup>, Christiane Deval<sup>1</sup>, Christophe Chambon<sup>2</sup>,  
Pierre Fafournoux<sup>1</sup> and Alain Bruhat<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>UMR 1019 of Human Nutrition and <sup>2</sup>Proteomic core facility, INRA de Theix, 63122 Saint Genès Champanelle, France

Received May 30, 2007; Revised August 2, 2007; Accepted August 3, 2007

## ABSTRACT

When an essential amino acid is limited, a signaling cascade is triggered that leads to increased translation of the ‘master regulator’, activating transcription factor 4 (ATF4), and resulting in the induction of specific target genes. Binding of ATF4 to the amino acid response element (AARE) is an essential step in the transcriptional activation of *CHOP* (a CCAAT/enhancer-binding protein-related gene) by amino acid deprivation. We set out to identify proteins that interact with ATF4 and that play a role in the transcriptional activation of *CHOP*. Using a tandem affinity purification (TAP) tag approach, we identified p300/CBP-associated factor (PCAF) as a novel interaction partner of ATF4 in leucine-starved cells. We show that the N-terminal region of ATF4 is required for a direct interaction with PCAF and demonstrate that PCAF is involved in the full transcriptional response of *CHOP* by amino acid starvation. Chromatin immunoprecipitation analysis revealed that PCAF is engaged on the *CHOP* AARE in response to amino acid starvation and that ATF4 is essential for its recruitment. We also show that PCAF stimulates ATF4-driven transcription via its histone acetyltransferase domain. Thus PCAF acts as a coactivator of ATF4 and is involved in the enhancement of *CHOP* transcription following amino acid starvation.

## INTRODUCTION

Mammals have evolved complex adaptative mechanisms that enable cells to survive many stressful environmental

conditions including amino acid limitation. The signal transduction pathway that is triggered in response to amino acid starvation is referred to as the amino acid response (AAR) (1). The initial step in the AAR is the activation by uncharged tRNAs of GCN2 kinase which phosphorylates the  $\alpha$  subunit of translation initiation factor eIF2 (eIF2 $\alpha$ ) on serine 51 (2,3). This phosphorylation decreases the translation of most mRNAs by inhibiting the delivery of the initiator Met-tRNA<sub>i</sub> to the initiation complex. However, eIF2 $\alpha$  phosphorylation also triggers the translation of specific mRNAs including the activating transcription factor 4 (ATF4). Once induced, ATF4 directly or indirectly induces transcription of specific target genes (4).

Among the genes induced via the GCN2/ATF4 pathway, the CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein (*CHOP*) encodes a ubiquitous transcription factor that heterodimerizes avidly with the other members of the C/EBP and jun/fos families (5–7). The amino acid regulation of *CHOP* transcription involves a *cis*-acting element in the promoter that has been named amino acid response element (AARE) (8). This element is essential for the induction of *CHOP* transcription by amino acid starvation and functions as an enhancer element. In the past few years, several functional AAREs have been described in other genes including *asparagine synthetase* (*ASNS*) (9,10) and *activating transcription factor 3* (*ATF3*) (11). The AARE sites of *CHOP*, *ASNS* and *ATF3* have a 9 bp core element (5'-<sup>A</sup>/<sub>G</sub>TT<sup>G</sup>/<sub>T</sub>CATCA-3') but the sequences differ by one or two nucleotides between genes.

It is now established that in amino acid-starved cells, a multiproteic complex is bound to the AARE sequences including a number of regulatory proteins such as ATF4 (9,11,12), C/EBP $\beta$  (13), ATF3 (10,12), activating transcription factor 2 (ATF2) (11,14) or tribbles-related

\*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 4 73 62 41 50; Fax: +33 4 73 62 47 55; Email: bruhat@clermont.inra.fr  
Correspondence may also be addressed to Pierre Fafournoux. Tel: +33 4 73 62 45 62; Fax: +33 4 73 62 47 55; Email: fpierre@clermont.inra.fr

protein 3 (TRB3) (15). These factors are involved in either inducing or repressing transcription of target genes in response to amino acid starvation. Importantly, all of the known AARE sites bind ATF4 whereas the binding activity and the role of other AARE-binding factors appear to vary according to the AARE sequence and chromatin structure. For example, *CHOP* and *ATF3* sequences also bind ATF2 whereas the *ASNS* site does not (8,11,12,16).

The key role of ATF4 in amino acid-regulated transcription has been clearly established in the past few years (1,10,11,14). It has been shown that (i) the expression of ATF4 and its binding to AARE sequences are increased following amino acid starvation, (ii) kinetic of ATF4 binding to AARE are similar between tested genes with a dramatic increase in the first hour after a single amino acid removal, sustained over the next two hours, (iii) in cells devoid of ATF4 expression, the induction of mammalian genes upon amino acid starvation is completely lost and (iv) when over-expressed, ATF4 by itself is able to activate the AARE-dependent transcription. One major role of ATF4 is to mediate part of cell response to stress signals such as ER stress or amino acid deprivation (17). Both transcription and translation of ATF4 are selectively increased in stress conditions (18,19), resulting in the induction of many genes involved in amino acid metabolism or transport and in resistance to oxidative stress (4).

ATF4 belongs to the basic region/leucine zipper (bZIP) family of transcription factors, which also includes members of the Jun/Fos (AP-1) family (20,21). This factor is known to form heterodimers with members of AP1 and CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) families (22–24) rather than proteins of the ATF/CREB family (25–27). Heterodimerization of ATF4 represents a powerful means to regulate its transcriptional activity and consequently the expression of target genes. ATF4 also interacts with coactivators such as p300 and CBP (28,29) and with several general transcription factors such as TBP, TFIIB, RAP30 (28) and RPB3 (30). In the context of the AAR, the heterodimeric partner of ATF4 on AARE remains to be identified. It has been suggested that ATF4 may also interact with one or more cofactors to make the promoter more accessible to the general transcription machinery (10) but these cofactors also remain to be identified.

The present study was designed to identify proteins interacting with ATF4 and playing a role in the transcriptional activation of *CHOP* in response to amino acid starvation. Recent progress in mass spectrometric protein sequencing technology together with the rapid growth of protein and genome databases have made direct approaches to map protein–protein interactions feasible. Using a tandem affinity purification (TAP) tag approach, we identify p300/CBP-associated factor (PCAF) as a novel interaction partner of ATF4 in amino acid-starved cells. Our results provide evidence that PCAF acts as a coactivator of ATF4 and is involved in the enhancement of *CHOP* transcription following amino acid starvation.

## MATERIALS AND METHODS

### Plasmid constructions

2X-CHOP-AARE-TK-LUC was generated as previously described (8). To express PCAF in mammalian cells, plasmids for wild-type (pCX-Flag-PCAF) and HAT-defective PCAF (pCX-Flag-PCAF  $\Delta$ HAT) were provided by Chao-Zhong Song (University of Washington, Seattle, WA). To express PCAF *in vitro*, pCI-Flag-PCAF was kindly given by Rosemary Kiernan (Montpellier, France). The expression plasmid for the ATF4 cDNA was a gift of Irina Lassot (Institut Cochin, Paris, France). To generate the GST–ATF4 (amino acids 1–351) and GST–ATF4 (amino acids 1–100) fusion proteins, the corresponding regions of human ATF4 cDNA were amplified by PCR and inserted into the BamHI/EcoRI sites of pGEX-4T-1 (Amersham). Constructs including other ATF4 deletion mutants fused to GST (glutathione-S-transferase) were kindly provided by Florence Margottin-Goguet (Institut Cochin, Paris, France). The mammalian ATF4 expression plasmid used in the TAP technique (pZome-1-N-TAP-ATF4) was generated by inserting the full-length coding region of human ATF4 cDNA into the EcoRI site of pZome-1-N (Euroscarf, Germany).

### Cell culture and treatment conditions

HeLa cells, mouse embryonic fibroblasts (MEF) and retroviral packaging cell line BOSC23 were cultured at 37°C in Dulbecco's modified Eagle's medium F12 (DMEM F12) (Sigma) containing 10% fetal bovine serum. When indicated, DMEM F12 lacking leucine was used. In all experiments involving amino acid starvation, 10% dialyzed calf serum was used. MEF deficient in ATF4 were kindly given by David Ron (Skirball Institute of Biomolecular Medicine, New York) (4).

### Generation of stable cell lines

Retroviral infection was performed as described (31). BOSC23 cells were transfected with either pZome-1-N (mock) or pZome-1-N-TAP-ATF4. After 48 h of transfection, the medium containing retroviruses was collected, filtered, treated by polybrene (1 mg/ml) and transferred on ATF4  $-/-$  MEF. Infected cells were selected with puromycin (2 mg/ml) for 3 weeks. The expression of TAP-ATF4 was analyzed by immunoblotting analysis with an anti-ATF4 antibody.

### Antibodies

The antibodies against ATF4 (sc-200), PCAF (sc-8999) and  $\beta$ -actin (sc-7210) were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc (Santa Cruz, CA, USA).

### Nuclear extract preparation

Nuclear extracts were prepared from HeLa cells and MEF as described previously (8).

### TAP purification

TAP–ATF4 complexes were purified using a published procedure (32) with minor modifications. Nuclear extracts



were prepared from thirty 150-mm plates of mock or ATF4-TAP-transfected cells and subsequently adjusted to IgG-binding conditions: 180 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.2% NP-40, 0.5 mM dithiothreitol (DTT), complete protease inhibitors (Sigma), 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate and 20 mM NaF. Diluted extracts were rotated overnight at 4°C with 100  $\mu$ l of IgG matrix (Amersham Biotech), after which the beads were washed extensively in binding buffer. Washed beads were re-suspended in TEV cleavage buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.3% NP-40, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM DTT), and 5–15  $\mu$ l of recombinant TEV enzyme (Invitrogen) was added to the mixture. After 2 h of rotation at 16°C, the TEV eluate from the IgG column was recovered and adjusted to calmodulin-binding conditions: 150 mM NaCl, 45 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.7 mM Mg-acetate, 0.7 mM imidazole, 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.2% NP-40, 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol and rotated for 2 h at 4°C with 50  $\mu$ l of calmodulin affinity resin (Stratagene). After binding, sedimented beads were washed extensively with calmodulin-binding buffer. Bound proteins were recovered by boiling the calmodulin beads for 5 min in protein sample buffer.

#### Sample preparation and mass spectrometric analysis

The protein complexes recovered from TAP purification were fractionated on a 7% SDS-polyacrylamide gel. Proteins were detected by silver staining. The protein bands on 1D gel were excised from gels using blade of scalpel. The bands were washed with 100  $\mu$ l of 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  for 30 min, destained with 100  $\mu$ l of 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ /acetonitrile (v/v) twice 30 min and dehydrated in acetonitrile. Bands were completely dried using a speed vac before trypsin digestion. The dried gel volume was evaluated and three volumes of trypsin (V5111; Promega, Madison, WI, USA), 10 ng/ $\mu$ l in 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  were added. Digestion was performed at 37°C during 5 h. The gels pieces were centrifuged and 8–12  $\mu$ l of acetonitrile (depending of gel volume) were added to extract peptides. The mixture was sonicated for 5 min and centrifuged. For MALDI-TOF MS analysis, 1  $\mu$ l of supernatant was loaded directly onto the MALDI target. The matrix solution (5 mg/ml -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50% acetonitrile/0.1% trifluoroacetic acid) was added immediately and allowed to dry at room temperature. A Voyager DE-Pro model of MALDI-TOF mass spectrometer (PerSeptive BioSystems, Farmingham, MA, USA) was used in positive-ion reflector mode for peptide mass fingerprinting. External calibration was performed with a standard peptide solution (Proteomix, LaserBio Labs, Sophia-Antipolis, France). Internal calibration was performed using peptides resulting from auto-digestion of porcine trypsin. Monoisotopic peptide masses were assigned and used from NCBI database searches with the 'Mascot' and 'Profound' softwares (<http://www.matrixscience.com> and <http://prowl.rockefeller.edu>).

#### GST pull-down experiments

Fresh overnight cultures of BL21 pLysS *Escherichia coli* strain transformed with GST-fused constructs were

diluted 1:10 in LB medium containing ampicillin (100  $\mu$ g/ml). Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside was added in growing exponential bacterial culture to a final concentration of 1 mM and incubated for 4 h at 30°C. Cells were re-suspended in STE buffer (10 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA). After 10 000g centrifugation during 10 min at 4°C, pellets were frozen during 5 min, re-suspended in STE buffer containing 1 mM dithiothreitol and 10% sarcosyl. Lysates were sonicated for 1 min and clarified at 10 000g for 10 min at 4°C. The bacterial supernatant was rocked overnight at 4°C with glutathione-Agarose resin (Sigma) and beads were washed three times in PBS containing Triton X-100 (0.1%) and PMSF (1 mM).  $^{35}\text{S}$ -labeled PCAF protein was generated *in vitro* using the TNT T7-coupled reticulocyte lysate system (Promega) according to the manufacturer's instructions.  $^{35}\text{S}$ -labeled PCAF protein or 1 mg of nuclear extracts were incubated with the beads in binding buffer (20 mM HEPES pH 7.4, 125 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 2 mM DTT), 2 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), 10  $\mu$ M  $\text{ZnCl}_2$ , complete protease inhibitors (Sigma) by rocking 2 h at 4°C. The glutathione-Agarose beads were then washed four times in PBS buffer containing 0.1% Triton X-100 and 160 mM NaCl and re-suspended in Laemmli buffer. Proteins were released from beads by boiling 5 min, and subjected to SDS-PAGE analysis. Fractionated proteins were visualized by western blot using anti-PCAF or anti-ATF4 antibodies or by autoradiography using a PhosphorImager and IMAGEQUANT software (Molecular Dynamics).

#### Transient transfection and luciferase (LUC) assay

Cells were plated in 12-well dishes and transfected by the calcium phosphate coprecipitation method as described previously (12). One microgram of luciferase plasmid was transfected into the cells along with 0.05  $\mu$ g of pCMV- $\beta$ Gal, a plasmid carrying the bacterial  $\beta$ -galactosidase gene fused to the human cytomegalovirus immediate-early enhancer/promoter region, as an internal control. Cells were then exposed to the precipitate for 16 h, washed twice in phosphate-buffered saline (PBS), and then incubated with DMEM F12 containing 10% fetal bovine serum. Two days after transfection, cells were harvested in 100  $\mu$ l of lysis buffer (Promega) and centrifuged at 13 000g for 2 min. Twenty micro liters of the supernatant were assayed for luciferase activity (YELEN, Ensue La Redonne, France). For all the transfection experiments presented, a plasmid pCMV- $\beta$ Gal was used as an internal control.  $\beta$ -Galactosidase activity was measured as described previously (12). Relative luciferase activity was given as the ratio of relative luciferase unit/relative  $\beta$ -Gal unit. All values are the means calculated from the results of at least three independent experiments performed in triplicate.

#### Analysis of gene expression using real-time RT-PCR

Total RNA was prepared using a RNeasy mini kit (Qiagen) and treated with DNase I, Amp Grade (Invitrogen) prior to cDNA synthesis. RNA integrity was electrophoretically verified by ethidium bromide

staining. RNA (0.5 µg) was reverse transcribed with 100 U of Superscript II plus RNase H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase (Invitrogen) using 100 µM random hexamer primers (Amersham Biosciences), according to the manufacturer's instructions. To measure the relative amount of human *CHOP*, *ATF4* and *PCAF* mRNA, primers were the following: *hCHOP* (forward primer, 5'-cagaaccagcagaggtcaca-3' reverse primer, 5'-agctgtgccacttctcttc-3'), *hATF4* (forward primer, 5'-aacgcacaaagacaccttcg-3'; reverse primer, 5'-acctatgaggtttgaagtgc-3') and *hPCAF* (Qiagen, QT00092267 #). All the primers yielded PCR products 200 bp in size. To control for RNA quality and cDNA synthesis,  $\beta$ -actin mRNA was also amplified with forward (5'-ctcgcaggtcaagagcaag-3') and reverse primers (5'-gacagctgctccaccttctt-3'). To measure the transcriptional activity from the *CHOP* gene, oligonucleotides derived from *CHOP* intron 1 and exon 1 were used to measure the short-lived unspliced transcript (hnRNA, heterogeneous nuclear RNA). This procedure for measuring transcriptional activity is based on that described by Lipson and Baserga (33). The primers for amplification were: forward primer, 5'-aaggcactgagcgtatcatgt-3'; reverse primer, 5'-ctctcggcaggtccctaact-3'. Quantification involved the use of standard curves that had been prepared with plasmids containing specific sequences of each gene. We cloned all the PCR products into the pGEM-T easy vector (Promega) according to the manufacturer's instructions. For the construction of standard curves, pGEM-T easy plasmids were prepared as 10-fold serial dilution in water, from 4 ng to 0.4 pg. PCR was carried out using a LightCycler<sup>TM</sup> System (Roche) as described previously (12). LightCycler quantification software (version 3.5) was used to compare amplification in experimental samples during the log-linear phase to the standard curve from the dilution series of control plasmids. Relative results were displayed in nanograms of target gene per 100 ng of  $\beta$ -actin. Each experiment was repeated three times to confirm the reproducibility of the results.

### Chromatin immunoprecipitation analysis (ChIP)

ChIP analysis was performed according to the protocol of Upstate Biotechnology, Inc. (Charlottesville, VA, USA) with minor modifications. Cells were seeded at  $1 \times 10^6$ /100 mm dish with DMEM F12 and grown for 24 h. Cells were transferred to fresh DMEM F12 12 h before transfer to either complete DMEM F12 or DMEM F12 lacking leucine for the time period indicated in each figure. Protein-DNA was cross-linked by adding formaldehyde directly to the culture medium to a final concentration of 1% and then stopped 8 min later by the addition of glycine to a final concentration of 0.125 M. Cross-linked chromatin was sonicated using a Vibra cell sonicator (Biorb Scientific Technology) for 10 bursts of 30 s at power 2 with 1-min cooling on ice between each burst to obtain DNA fragments of an average of 400 bp. Extracts from  $1 \times 10^6$  cells were incubated with 5 µg of antibody. A rabbit anti-chicken IgG was used as the nonspecific antibody control. The antibody-bound complex was precipitated by protein A-Agarose beads (Upstate Biotechnology). The DNA fragments in the

immunoprecipitated complex were released by reversing the cross-linking overnight at 65°C and purified using a phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation. Real-time quantitative PCR was performed by using a LightCycler (Roche) and a SYBR-Green-I-containing PCR mix (Qiagen), following the recommendations of the manufacturer. The immunoprecipitated material was quantified relative to a standard curve of genomic DNA. Primers used for human sequences: *hCHOP* amplicon A, 5'-gcagcctaaccacaaagacgtg-3' and 5'-ggaggcaacttgacaaaag-3'; *hCHOP* amplicon B (AARE), 5'-aagaggctcagcaggacta-3' and 5'-atgatgcaatgtttggcaac-3'; *hCHOP* amplicon C, 5'-agtgcacggagaaagctaa-3' and 5'-ccatacagcagcctgagtga-3'. Primers used for mouse sequences: *mCHOP* AARE, 5'-gggcagacaagttcagggaag-3' and 5'-atgatgcaatgtttggcaac-3'. The reactions were incubated at 95°C for 15 min to activate the polymerase, followed by amplification at 95°C for 15 s, 55°C for 20 s and 72°C for 20 s for 45 cycles. After PCR, melting curves were acquired by stepwise increases in the temperature from 65 to 95°C to ensure that a single product was amplified in the reaction. The results are expressed as the percentage of antibody binding versus the amount of PCR product obtained using a standardized aliquot of input chromatin. Samples are the means from at least three independent immunoprecipitations.

### SiRNA preparation and transfection

SiRNA corresponding to PCAF mRNA (5'-ucgccgugaagaagcgcadTdT-3' and 5'-ugcgcuuucucacggcgadTdT-3') (1024864 #) and to control (1027280 #) were from Qiagen. Annealing was performed as described by the manufacturer: the complementary two strands (each 5 nmol) in 250 µl of siRNA suspension buffer (Qiagen) were heated 1 min at 90°C and then incubated for 1 h at 37°C. One day before transfection with siRNA, HeLa cells were plated in 6-well plates at 25% confluency. Then 30 pmol of siRNA were introduced into the cells using the calcium phosphate precipitation as described above. Forty-eight hours after transfection, the expression level of PCAF was analyzed by western blotting.

### Immunoblot analysis

Cells were lysed in radioimmune precipitation assay buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 50 mM NaF, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 100 nM acid okadaic, 25 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, protease inhibitor cocktail from Sigma), then proteins were resolved by SDS-PAGE and transferred onto a Hybond-P PVDF membrane (Amersham Biosciences). Membranes were blocked for 1 h at room temperature with a solution of 5% nonfat milk powder in TN (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20). The blots were then incubated with primary antibody in blocking solution overnight at 4°C. Antibodies were diluted according to the manufacturer's instructions. The blots were washed three times in TN and incubated with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:5000) (Santa Cruz, CA, USA) in blocking buffer for 1 h at room temperature.

After three washes, the blots were developed using the enhanced chemiluminescence (ECL) detection system (Amersham Biosciences).

## RESULTS

### Identification of PCAF as an interaction partner of ATF4 by TAP

To identify ATF4 interacting proteins in mammalian cells, we performed TAP coupled with mass spectrometry (34). We developed a mammalian expression vector coding for a fusion protein consisting of amino acids 1–351 of ATF4 linked to the TAP tag (Supplementary Figure 1A). In this construct, the TAP tag consists of the protein A (Prot.A) and the calmodulin-binding peptide affinity sequences that are separated by the recognition sequence for tobacco etch virus (TEV) protease, permitting proteolytic elution of the fusion protein from the IgG affinity resin (32,34). The constructs expressing the ATF4 fusion protein (TAP-ATF4<sup>1–351</sup>) or the tag alone (TAP) were stably transfected into ATF4 <sup>–/–</sup> mouse MEF. We chose ATF4-deficient cells because absence of endogenous ATF4 expression was expected to increase purification efficiency. Supplementary Figure 1B shows that in ATF4 <sup>–/–</sup> MEF expressing TAP proteins, the endogenous form of ATF4 was not detected in the absence of leucine (compare lanes 3–5 with lane 2). To check the functionality of TAP-ATF4<sup>1–351</sup> protein, a LUC reporter driven by two copies of the *CHOP* AARE was transiently transfected into ATF4 <sup>–/–</sup> MEF. Supplementary Figure 1C shows that this fusion protein activated the AARE-dependent transcription and produced about the same transcriptional response as obtained with the wild-type form of ATF4. Cells expressing TAP proteins were incubated for 2 h in control medium or in medium lacking leucine, and nuclear extracts were prepared and applied to dual affinity chromatography according to the TAP protocol (32). Bands representing putative ATF4-binding proteins were purified by SDS-PAGE and analyzed by MALDI-TOF (data not shown). Comparison of the obtained peptide sequences with protein databases identified several proteins that had been previously linked to RNA transcription. Here we report the identification of p300/CBP-associating factor (PCAF) as a novel interaction partner of ATF4 in leucine-starved cells.

### The N-terminal region of ATF4 is required for a direct interaction with PCAF

To confirm that PCAF can be a partner of ATF4, *in vitro* pull-down assays were performed. Bacterially expressed GST-ATF4 (amino acids 1–351) fusion protein was immobilized on glutathione beads and later incubated with nuclear extracts from HeLa cells starved for 2 h with leucine. Immunoblot analysis revealed that PCAF present in nuclear extracts from leucine-starved HeLa cells was retained specifically with the full-length ATF4 (Figure 1A). No interaction of PCAF with GST alone could be detected. These results show that the interaction observed by the TAP method can also be reconstituted *in vitro*.

To find which domain of ATF4 is required for the interaction with PCAF, truncated ATF4 derivatives were used in GST pull-down assays (Figure 1B). As shown in Figure 1C, ATF4 deleted of residues 282–351 including the bZIP domain (lane 2) retained PCAF-binding capacity. By contrast, ATF4 deleted of residues 1–85 (lane 3) or other larger deletion mutants (lanes 4 and 5) did not interact with PCAF like GST alone (lane 6) used as a control, suggesting that the N-terminal region of ATF4 is required for the interaction with PCAF. From these results, we cannot exclude the possibility that the ATF4–PCAF interaction is not direct and requires specific accessory factors present in eukaryotic cell nuclear extracts. To demonstrate the direct interaction between PCAF and the N-terminus of ATF4, we monitored the binding of <sup>35</sup>S-PCAF produced *in vitro* to full-length, N-terminal (amino acids 1–100) or ATF4 deleted of residues 1–85 fused to GST (Figure 1D). Only the full-length and the 1–100 N terminal derivatives (lanes 2 and 3) showed consistent interaction with PCAF. These data demonstrate that ATF4–PCAF interaction occurs through a direct interaction involving the N-terminal region of ATF4.

### Effect of amino acid starvation on PCAF mRNA and protein

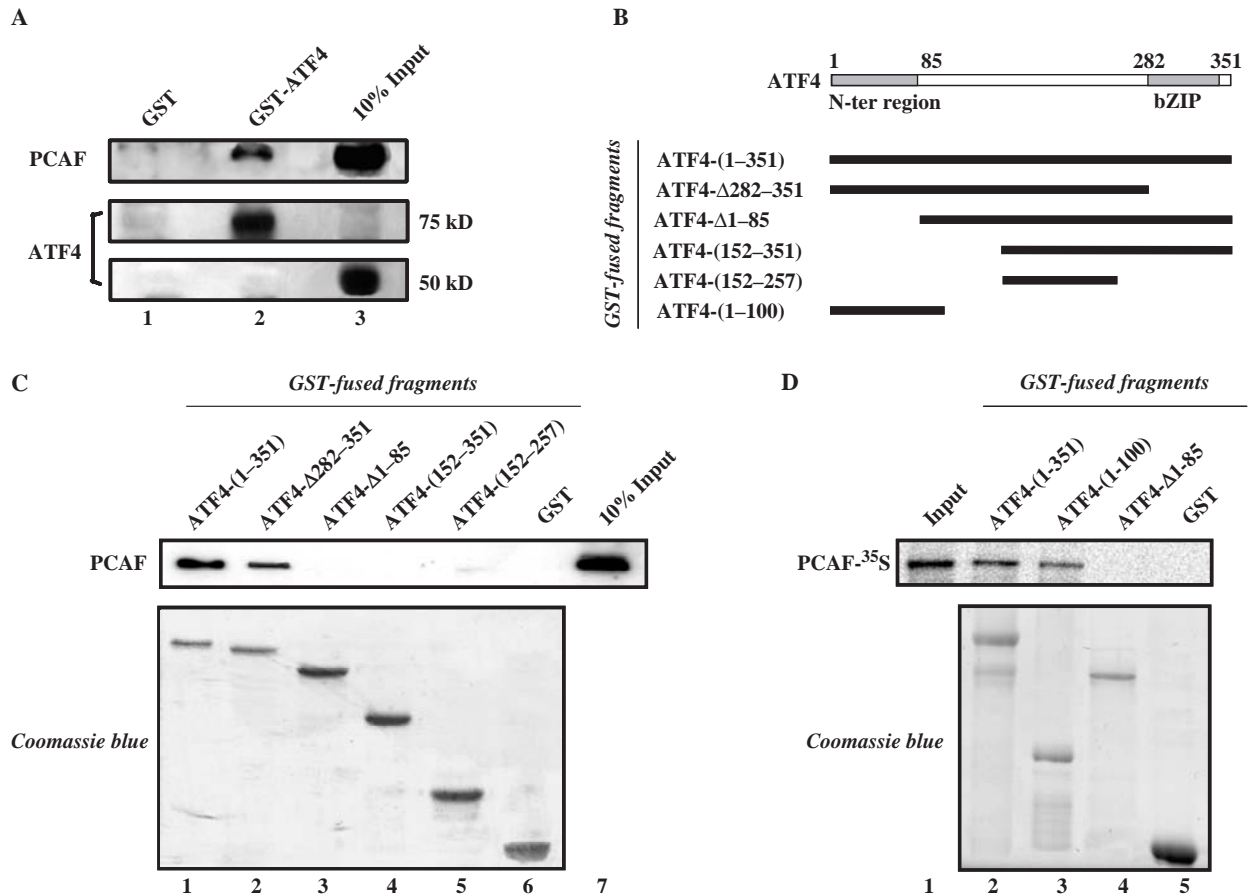
To further identify the role of PCAF in amino acid-regulation of *CHOP* transcription in human cells, we first examined the effect of leucine starvation on the PCAF mRNA and protein levels in HeLa cells. Kinetic analysis of mRNA level indicated that PCAF mRNA was not affected by amino acid starvation while ATF4 and *CHOP* mRNA were increased (Figure 2A). Protein analysis showed that the expression of PCAF was not significantly affected by 1–2 h of leucine starvation. However, PCAF level was greatly reduced following 4–8 h of amino acid starvation while ATF4 level was markedly increased (Figure 2B).

### Binding of ATF4 to the *CHOP* AARE *in vivo* is associated with binding of PCAF in response to amino acid starvation

Using a ChIP analysis, we had previously demonstrated that following amino acid starvation, ATF4 binds to the AARE sequence within the *CHOP* promoter *in vivo* (14). To determine whether PCAF also targets the *CHOP* AARE, HeLa cells were incubated in control or leucine-free medium for 2 h and ChIP assays were performed with primer sets covering either the 5' region (amplicon A), the AARE (amplicon B) or the first intron (amplicon C) of the *CHOP* gene (Figure 3A). The results show recruitment of both PCAF and ATF4 to the AARE following 2 h of leucine deprivation (Figure 3B). In addition, bindings of PCAF and ATF4 were not detected in the 5' region or in the first intron of *CHOP*, confirming that both factors are specifically engaged on the AARE.

We then investigated the kinetics of PCAF engagement on the *CHOP* AARE in response to amino acid starvation. PCAF recruitment increased slightly after 1 h of leucine deprivation, peaked at 2 h and fell within 2–8 h of amino acid deprivation (Figure 3C). Comparison of these kinetics with those obtained for ATF4 binding





**Figure 1.** PCAF interacts directly with the N-terminal region of ATF4. **(A)** Bacterially expressed GST-ATF4 (amino acids 1–351) fusion protein was immobilized on glutathione beads and incubated with nuclear proteins from leucine-starved HeLa cells (2 h). After extensive washing, proteins bound to the beads were eluted in protein sample buffer and analyzed by western blotting with anti-PCAF (top) or anti-ATF4 (bottom) antibodies. The expression of the endogenous (50 kDa) and the recombinant ATF4 proteins (75 kDa) are visualized. Ten percent of the nuclear extracts used in the pull-down experiments were loaded in the Input lane 3. **(B)** Schematic representation of the ATF4 deletions employed in the experiments reported in **(C)** and **(D)**. The basic region/leucine zipper (bZip) and the N-terminal (N-ter region) domains are indicated. **(C)** Nuclear extracts from leucine-starved HeLa cells (2 h) were used in GST pull-down experiments with bacterially expressed full length ATF4 wt (lane 1) or various deletion mutants fused to GST (lanes 2–5). PCAF bound to the GST-ATF4 constructs was detected by western blot with anti-PCAF antibody. Ten percent of the nuclear extracts used in the pull-down experiments were loaded in the Input lane 7. The amount of GST-fused recombinant proteins was monitored by Coomassie blue staining. **(D)** *In vitro* pull-down assay of <sup>35</sup>S-labeled PCAF against full-length (lane 2), or two ATF4-deletion mutants (lanes 3 and 4) fused to GST. The input (lane 1) was loaded with the amount of <sup>35</sup>S-labeled proteins used in the binding reactions. The amount of GST-fused recombinant proteins was monitored by Coomassie blue staining, and radioactive signals of radiolabeled proteins were analyzed using a phosphorimaging device.

reveals a similarity in the time courses of recruitment of these two factors. Also, by plotting the pre-mRNA content on the same graph, it is apparent that the engagement of PCAF and ATF4 closely paralleled the increase in *CHOP* transcription in the first 2 h.

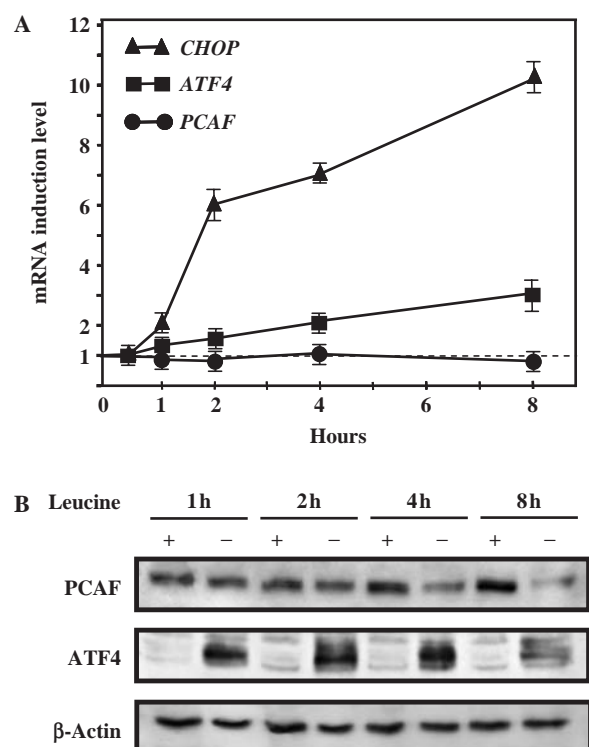
#### ATF4 is essential for PCAF recruitment to the *CHOP* AARE following amino acid starvation

In previous studies, ATF4 was shown to be essential for *CHOP* induction in response to leucine starvation (12). The results described above suggest that ATF4 may be involved in PCAF recruitment to *CHOP* AARE following amino acid starvation. To investigate the link between binding of ATF4 to the *CHOP* AARE and the recruitment of PCAF, ChIP experiments were performed in MEFs deficient in ATF4 and in the corresponding wild-type cells. The ChIP results obtained with wild-type MEFs

are consistent with those described above with HeLa cells (Figure 4A). By contrast, in cells lacking ATF4, the increase in PCAF binding to the *CHOP* AARE was lost. Protein analysis shows that the lack of ATF4 did not affect the level of PCAF expression (Figure 4B). Taken together, these results demonstrate that ATF4 is essential for the recruitment of PCAF on the *CHOP* AARE following amino acid starvation.

#### PCAF stimulates ATF4-driven transcription via its histone acetyltransferase (HAT) domain

Several studies have shown that PCAF is a transcription coactivator with intrinsic acetylase activity (35). Having established that ATF4 recruits PCAF on the *CHOP* AARE, we sought to determine whether PCAF functioned as a coactivator of ATF4 in AARE-dependent transcription. Cotransfection experiments were carried out in HeLa

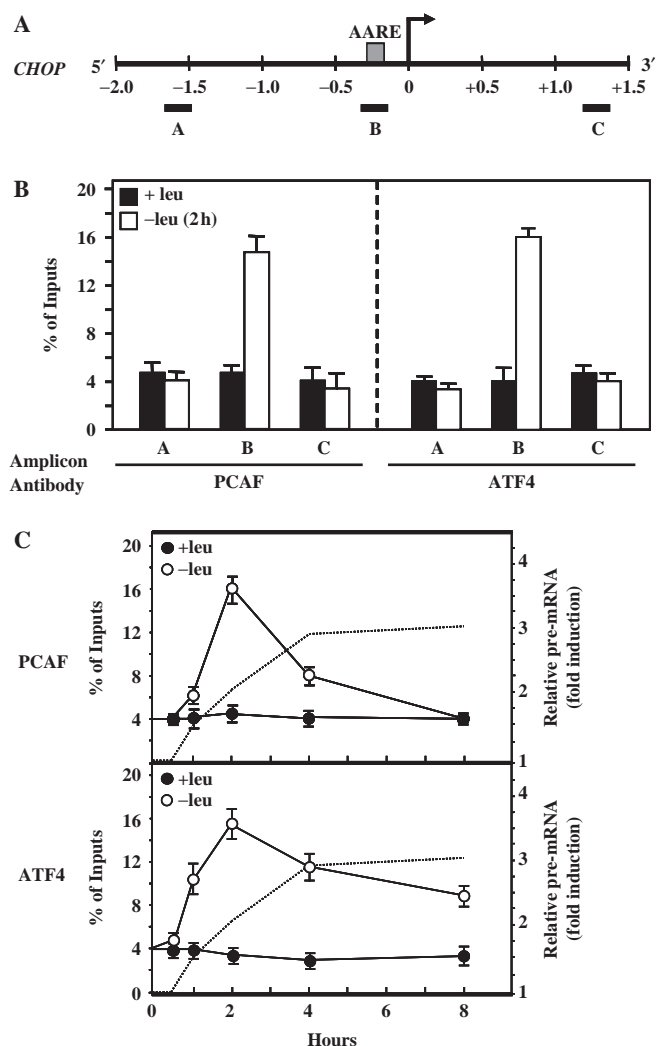


**Figure 2.** Measurement of PCAF mRNA and protein accumulation in amino acid-starved cells. HeLa cells were incubated either in control (+) or leucine-free medium (–) and harvested for protein extraction and RNA isolation after the indicated incubation times. (A) Total RNA was extracted and real-time RT-PCR was performed as described in Materials and Methods section. The mRNA induction level is defined as the ratio of the relative mRNA level of leucine-starved cells to that of non-starved cells. (B) PCAF, ATF4 and  $\beta$ -Actin protein contents were analyzed by western blots as described in Materials and Methods section.

cells using a LUC reporter driven by two copies of the *CHOP* AARE and the expression plasmids for ATF4 and PCAF or their respective empty vectors. This assay revealed that PCAF stimulated ATF4-driven transcription but had no effect by itself on luciferase expression (Figure 5). By contrast, an HAT-defective PCAF containing a deletion of amino acids 497–526 (36) failed to stimulate ATF4-driven transcription. These results demonstrate that PCAF functions as a coactivator of ATF4 and show that PCAF HAT activity is required for ATF4/PCAF synergistic activation of the AARE-dependent transcription.

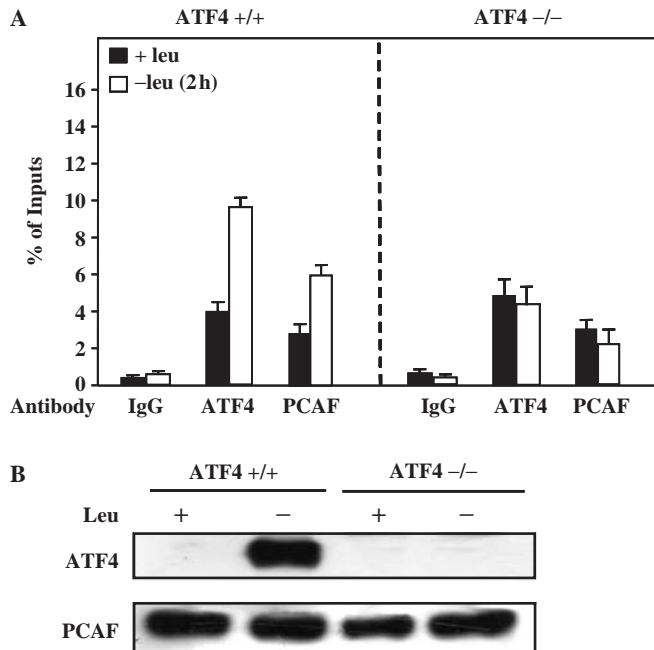
#### PCAF is required for the full transcriptional response of *CHOP* to leucine starvation

To assess the role of PCAF in the amino acid regulation of *CHOP* expression, we first measured the effect of leucine starvation on both *CHOP* mRNA content and AARE-dependent transcription in PCAF-deficient cells. We employed small interfering double-stranded RNA (siRNA) transfection to specifically inhibit the endogenous expression of PCAF. HeLa cells were transfected with either siPCAF or control siRNA, and then incubated with either control or leucine-free medium for 2 h.



**Figure 3.** PCAF recruitment to *CHOP* AARE in response to leucine starvation. (A) Scheme of the human *CHOP* gene indicating the different amplicons produced for the ChIP analysis: A (–1678 to –1478), B (–472 to –301) and C (+1163 to +1372). The AARE is boxed in gray. (B) HeLa cells were incubated 2 h either in control (+leu) or leucine-free medium (–leu) and harvested. ChIP analysis was performed as described under Materials and Methods section using antibodies specific for PCAF and ATF4 and different sets of primers to produce amplicon A, B or C. Data are plotted as the percentage of antibody binding versus the amount of PCR product obtained using a standardized aliquot of input chromatin. Each point represents the mean value of three independent experiments, and the error bars represent the SEM. (C) Time course of PCAF and ATF4 recruitments during leucine starvation. HeLa cells were incubated either in control (+leu) or leucine-free medium (–leu) and harvested for 0–8 h. ChIP analysis was performed using antibodies specific for PCAF and ATF4 and a set of primers to amplify amplicon B (see above). Total RNA was extracted and the *CHOP* transcriptional activity was determined by real-time RT-PCR analysis of *CHOP* pre-mRNA as described under Materials and Methods section. The dotted line represents the increase in *CHOP* pre-mRNA induction level.

Figure 6A shows that PCAF-siRNA transfection dramatically decreased the PCAF protein content but did not affect the increase in ATF4 expression. Lack of PCAF affected the response of *CHOP* transcription to leucine depletion: the induction of *CHOP* mRNA and the AARE-dependent transcription were significantly reduced.

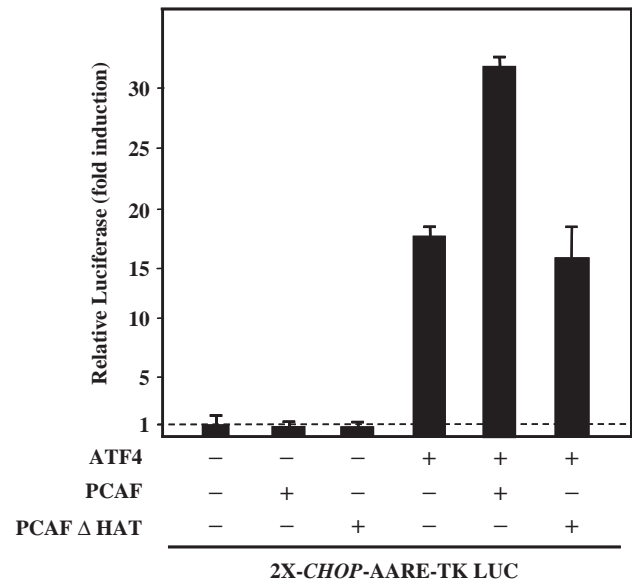


**Figure 4.** Role of ATF4 in PCAF recruitment to *CHOP* AARE in response to leucine starvation. ATF4 +/+ and ATF4 -/- MEF were incubated 2 h either in control (+leu) or leucine-free medium (-leu) and harvested. **(A)** ChIP analysis was performed as described under Materials and Methods section using antibodies specific for PCAF and ATF4 and a set of primers to produce amplicon B (Figure 3A). Data were plotted as the percentage of antibody binding versus the amount of PCR product obtained using a standardized aliquot of input chromatin. Each point represents the mean value of three independent experiments and the error bars represent the SEM. We note that there remains 5% of ATF4 antibody binding in ATF4 KO cells. ChIP experiments were also performed with primer sets reaching much farther upstream or downstream from the *CHOP* gene (data not shown). The results indicate that the amount of ATF4 binding in ATF4-deficient cells was due to the background observed for the ATF4 antibody. **(B)** Western blot analysis of ATF4 and PCAF was performed from nuclear extracts.

In control siRNA-transfected cells, the response to leucine starvation was not affected. We then examined the effect of over-expressing PCAF on the increase in *CHOP* mRNA in response to leucine starvation (Figure 6B). HeLa cells were transiently transfected with PCAF or the empty vector and then incubated either with control or leucine-free medium for 2 h. Over-expression of PCAF protein leads to a significant increase in the amino acid inducibility of *CHOP*. Taken together, these results demonstrate that PCAF is required to obtain maximal induction of *CHOP* by leucine starvation.

## DISCUSSION

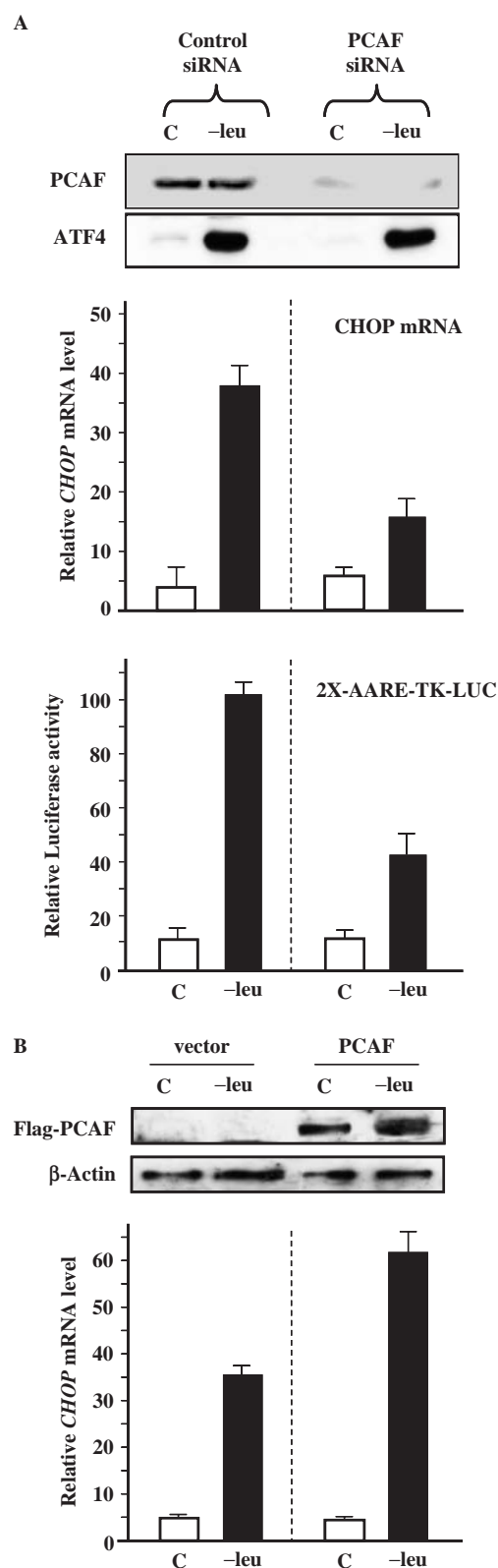
Mammalian cells have evolved complex cellular responses to stress conditions. Both transcription and translation of ATF4 are selectively increased in response to amino acid deprivation (17), even when global protein synthesis is repressed, resulting in the induction of a wide variety of ATF4 target genes (1). The data reported in the present study yield several novel findings regarding the



**Figure 5.** Role of PCAF in the stimulation of ATF4 transcriptional activity. HeLa cells were transiently transfected with a luciferase construct containing two copies of the *CHOP* AARE inserted 5' to the TK promoter (2X-*CHOP*-AARE-TK-LUC), the expression vector for ATF4, PCAF or HAT-defective mutant PCAF (PCAFΔHAT) or the empty vector, as indicated. Two days after transfection, cells were harvested for preparation of cell extracts and determination of LUC activity. Results are given as the 'fold induction' relative to the cells transfected with empty vector. For all the transfection experiments presented, a plasmid pCMV-βGal was used as an internal control. Relative luciferase activities were determined as described in Materials and Methods section. Each data represents the mean of at least three independent experiments performed in triplicate.

mechanisms by which ATF4 activates gene transcription upon amino acid starvation: (i) we have found evidence that the N-terminal region of ATF4 interacts directly with PCAF in amino acid-starved cells, (ii) we demonstrate that PCAF is involved in enhancing the transcriptional response of *CHOP* by amino acid starvation, (iii) we establish that PCAF is recruited on the *CHOP* AARE in response to amino acid starvation and that ATF4 is essential for its recruitment and (iv) we show that PCAF enhances ATF4-driven transcription via its HAT domain.

PCAF has been described as a coactivator that mediates the transcription of many genes (37). Like a number of transcriptional coactivators, this factor possesses an intrinsic histone acetylase activity (38,39). The role of PCAF in transcription has been investigated in multiple studies, and its requirement as a HAT and coactivator has been described for nuclear receptor- (40,41) and growth factor-mediated (42) activations and for myogenesis (43) among other processes. Here we report evidence that PCAF functions as a coactivator of ATF4 in the transcriptional response of *CHOP* following amino acid starvation. Like several nuclear proteins such as CBP and p300, PCAF interacts directly with the ATF4 N-terminal domain, shown to be a transcriptional activation domain (28). We also show that the HAT activity of PCAF is required for enhancing the activation of the AARE-dependent transcription by ATF4. PCAF preferentially



**Figure 6.** Effect of PCAF knockdown or PCAF over-expression on the amino acid regulation of *CHOP* expression. **(A)** Effect of PCAF knockdown. HeLa cells were transfected with PCAF siRNA or control siRNA. Two days after siRNA transfection, cells were incubated for 2 h in control (C) or in medium lacking leucine (–leu) and then harvested to extract RNA and proteins. Total RNA was extracted and real-time

acetylates lysine 14 of histone H3 but also less efficiently acetylates lysine 8 of histone H4 (44). At present, the exact role of the HAT activity of PCAF in promoting the AARE-dependent transcription by ATF4 remains to be established. However, there are several lines of evidence suggesting that PCAF is not involved in histone acetylation at the *CHOP* promoter. First, we recently reported that the acetylation status of histone H3 remained unchanged at the *CHOP* AARE region within 1 h of removal of leucine from the medium while the acetylation of H4 is increased (14). Second, in ATF4-deficient cells, where the recruitment of PCAF was completely lost, we had also previously shown that the level of histone H4 acetylation remained elevated (14). Last, we now show that the HAT activity of PCAF is required to stimulate the transcriptional activity of ATF4 on a non-integrated *CHOP* AARE-reporter bacterial plasmid. In addition to histones, a number of transcription factors are also substrates for acetylation by nuclear HAT (45–47). The consequences of acetylation on protein function range from one protein to another depending on where in the protein the acetylation takes place. Acetylation has been reported to modulate protein–protein interactions, inhibit nuclear export (48) and alter protein stability (29). CBP and p300 were described as acetylating ATF4 in its bZIP domain and enhancing its transcriptional activity (28,29). In addition, Gachon *et al.* (49) have found evidence that acetylation of ATF4 *in vitro* is mediated by p300 but not by PCAF. In our model, the target of the PCAF HAT domain in the transcriptional activation of *CHOP* upon amino acid starvation remains to be identified.

The present experiments demonstrate that ATF4 binding is essential for the transitory recruitment of PCAF on the *CHOP* AARE following amino acid starvation. PCAF recruitment on the *CHOP* AARE falls within 2–8 h of leucine deprivation, while *CHOP* transcription is still increased. Therefore, ATF4-mediated PCAF recruitment is essential in enhancing the transcription of *CHOP* in response to a short period of amino acid starvation. It is possible that another cofactor may be involved in the ATF4-dependent response of *CHOP* during long-term amino acid deprivation. The drop in PCAF recruitment might be explained by the decrease in PCAF expression level observed following 4–8 h of amino acid starvation, while ATF4 is still bound to the AARE. The ubiquitin-proteasome degradation pathway plays an

RT-PCR was performed as described in Materials and Methods section. PCAF and ATF4 protein contents were analyzed by western blot. One day after siRNA transfection, cells were transfected with 2X-*CHOP*-AARE-TK-LUC reporter construct to measure the AARE-dependent transcription. After two days, cells were incubated for 16 h in control (C) or in medium lacking leucine (–leu) and cells were then harvested. LUC activity was measured as described in Materials and Methods section. **(B)** Effect of PCAF over-expression. HeLa cells were transiently transfected with Flag-PCAF expression construct (PCAF) or with empty vector (vector). Two days after transfection, cells were incubated for 2 h in control (C) or in medium lacking leucine (–leu) and then harvested to extract RNA and proteins. Total RNA was extracted and real-time RT-PCR was performed as described in Materials and Methods section. Each data represents the mean of at least three independent experiments performed in triplicate. Flag-PCAF and β-Actin protein contents were analyzed by western blot.



important role in transcription regulation to assure the controlled and timely termination of signaling by irreversible destruction of the activated transcription regulators. PCAF has been shown to be a target for the E3 ubiquitin ligase MDM2 (50). However, the enhancement of the PCAF degradation by leucine starvation remains to be demonstrated.

Our present findings provide evidence that PCAF is required to obtain maximal induction of *CHOP* transcription in response to leucine starvation. We have recently reported that following amino acid starvation, phosphorylation of ATF2 at the *CHOP* AARE occurs prior to ATF4 binding, histone acetylation, and increase in *CHOP* mRNA (14). We have further shown that ATF2 is involved in promoting the modification of the chromatin structure to enhance *CHOP* transcription (14). ATF2 was not identified in our ATF4-TAP screen. We have recently examined the formation of the ATF2/ATF4 heterodimer by *in vitro* translated proteins in gel shift assays. ATF2 and ATF4 do not form a heterodimer that binds the *CHOP* AARE sequence (data not shown). Therefore, it is unlikely that ATF2 and ATF4 interact *in vivo* on the *CHOP* promoter. Although it is well established that ATF2 can interact directly with p300 and CBP coactivators (51,52), the interaction of PCAF with ATF2 on the AARE remains to be shown. ATF4 may also participate in the trigger mechanism of *CHOP* transcriptional activation, promoting further recruitment of activator proteins such as PCAF to the promoter. Among the potential ATF4-binding proteins we have identified, PCAF is the only one with HAT activity. Using a ChIP approach, we have recently observed that p300 and CBP are present constitutively in the *CHOP* AARE-binding complex (data not shown). Whether these coactivators interact directly with ATF4 is unanswered. Further experiments will be required to study their role in the amino acid regulation of *CHOP* transcription. Taken together, the results demonstrate that following amino acid starvation there is a highly coordinated time-dependent program of interaction between a precise set of ATF subfamily members and coactivators leading to transcriptional activation of *CHOP*.

ATF4 has been shown to be a master regulator of a number of amino acid-regulated gene transcription such as *CHOP* and *ASNS* (1). Although *CHOP* and *ASNS* AARE sequences exhibit some structural and functional similarities, there are significant differences in the molecular mechanisms involved in the induction of *CHOP* following amino acid starvation and those described for *ASNS*. Using a ChIP approach, Chen *et al.* (10) did not observe any significant recruitment of PCAF to the *ASNS* promoter in response to amino acid limitation. We show here that PCAF is recruited specifically to the *CHOP* AARE to enhance the ATF4 transcriptional activity. By contrast, in the context of the *ASNS* AARE sequences, we also observe that ATF4 did not require PCAF to activate *ASNS* transcription in response to amino acid starvation (data not shown). As suggested by Chen *et al.* (10), ATF4 may act as a recruiting factor for an unknown HAT activity making the *ASNS* promoter more accessible to RNA Pol II and the general transcription machinery,

but it is clear that PCAF is not involved. It is possible that another ATF4-interacting factor not present in the *ASNS* AARE-binding complex may also be essential for PCAF recruitment on the *CHOP* AARE. All these data suggest that although most of the amino acid-responsive genes have AARE sites that are similar in sequence, the key regulator ATF4 and other distinct transcription factors and coactivators may be involved in modulating transcriptional activation. These differences in mechanism would permit flexibility among amino acid-regulated genes in the rapidity and magnitude of the transcriptional response for the same initial signal. Further insight into how the transcriptional machinery assembles at the amino acid-responsive gene promoter and modulates transcription will improve our understanding of the molecular steps required for nutritional control by the amino acid response pathway.

## SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR Online.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Sylvère Baron and Laurent Leotoing for helpful discussions about GST pull-down assays. This work was supported by grants from the Institut National de la Recherche Agronomique and the Région Auvergne. Funding to pay the Open Access publication charges for this article was provided by the Institut National de la Recherche Agronomique.

*Conflict of interest statement.* None declared.

## REFERENCES

- Kilberg, M.S., Pan, Y.X., Chen, H. and Leung-Pineda, V. (2005) Nutritional control of gene expression: how mammalian cells respond to amino acid limitation\*. *Annu. Rev. Nutr.*, **25**, 59–85.
- Kimball, S.R. and Jefferson, L.S. (2004) Amino acids as regulators of gene expression. *Nutr. Metab. (Lond.)*, **1**, 3.
- Wek, R.C., Jiang, H.Y. and Anthony, T.G. (2006) Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem. Soc. Trans.*, **34**, 7–11.
- Harding, H.P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P.D., Calfon, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B. *et al.* (2003) An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol. Cell*, **11**, 619–633.
- Ron, D. and Habener, J.F. (1992) CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes Dev.*, **6**, 439–453.
- Luethy, J.D. and Holbrook, N.J. (1992) Activation of the gadd153 promoter by genotoxic agents: a rapid and specific response to DNA damage. *Cancer Res.*, **52**, 5–10.
- Sylvester, S.L., Ap Rhys, C.M., Luethy-Martindale, J.D. and Holbrook, N.J. (1994) Induction of GADD153, a CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)-related gene, during the acute phase response in rats. Evidence for the involvement of C/EBPs in regulating its expression [published erratum appears in *J. Biol. Chem.*, 1995 Jun 16; **270**, 14842]. *J. Biol. Chem.*, **269**, 20119–20125.
- Bruhat, A., Jousse, C., Carraro, V., Reimold, A.M., Ferrara, M. and Fafournoux, P. (2000) Amino acids control mammalian gene transcription: activating transcription factor 2 is essential for the amino acid responsiveness of the *CHOP* promoter. *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 7192–7204.



9. Siu, F., Bain, P.J., LeBlanc-Chaffin, R., Chen, H. and Kilberg, M.S. (2002) ATF4 is a mediator of the nutrient-sensing response pathway that activates the human asparagine synthetase gene. *J. Biol. Chem.*, **277**, 24120–24127.
10. Chen, H., Pan, Y.X., Dudenhausen, E.E. and Kilberg, M.S. (2004) Amino acid deprivation induces the transcription rate of the human asparagine synthetase gene through a timed program of expression and promoter binding of nutrient-responsive basic region/leucine zipper transcription factors as well as localized histone acetylation. *J. Biol. Chem.*, **279**, 50829–50839.
11. Pan, Y.X., Chen, H., Thiaville, M.M. and Kilberg, M.S. (2007) Activation of the ATF3 gene through a co-ordinated amino acid-sensing response programme that controls transcriptional regulation of responsive genes following amino acid limitation. *Biochem. J.*, **401**, 299–307.
12. Averous, J., Bruhat, A., Jousse, C., Carraro, V., Thiel, G. and Fafournoux, P. (2004) Induction of CHOP expression by amino acid limitation requires both ATF4 expression and ATF2 phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, **279**, 5288–5297.
13. Siu, F., Chen, C., Zhong, C. and Kilberg, M.S. (2001) CCAAT/enhancer-binding protein-beta is a mediator of the nutrient-sensing response pathway that activates the human asparagine synthetase gene. *J. Biol. Chem.*, **276**, 48100–48107.
14. Bruhat, A., Cherasse, Y., Maurin, A.C., Breitwieser, W., Parry, L., Deval, C., Jones, N., Jousse, C. and Fafournoux, P. (2007) ATF2 is required for amino acid-regulated transcription by orchestrating specific histone acetylation. *Nucleic Acids Res.*, **35**, 1312–1321.
15. Jousse, C., Deval, C., Maurin, A.C., Parry, L., Cherasse, Y., Chaveroux, C., Lefloch, R., Lenormand, P., Bruhat, A. *et al.* (2007) TRB3 inhibits the transcriptional activation of stress-regulated genes by a negative feedback on the ATF4 pathway. *J. Biol. Chem.*, **282**, 15851–15861.
16. Bruhat, A., Averous, J., Carraro, V., Zhong, C., Reimold, A.M., Kilberg, M.S. and Fafournoux, P. (2002) Differences in the molecular mechanisms involved in the transcriptional activation of the CHOP and asparagine synthetase genes in response to amino acid deprivation or activation of the unfolded protein response. *J. Biol. Chem.*, **277**, 48107–48114.
17. Harding, H.P., Novoa, I.I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M. and Ron, D. (2000) Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol. Cell*, **6**, 1099–1108.
18. Lu, P.D., Harding, H.P. and Ron, D. (2004) Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. *J. Cell. Biol.*, **167**, 27–33.
19. Vattam, K.M. and Wek, R.C. (2004) Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **101**, 11269–11274.
20. Karpinski, B.A., Morle, G.D., Huggenvik, J., Uhler, M.D. and Leiden, J.M. (1992) Molecular cloning of human CREB-2: an ATF/CREB transcription factor that can negatively regulate transcription from the cAMP response element. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **89**, 4820–4824.
21. Ameri, K. and Harris, A.L. (2007) Activating transcription factor 4. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, Jan 28; [Epub ahead of print].
22. Kato, Y., Koike, Y., Tomizawa, K., Ogawa, S., Hosaka, K., Tanaka, S. and Kato, T. (1999) Presence of activating transcription factor 4 (ATF4) in the porcine anterior pituitary. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **154**, 151–159.
23. Gachon, F., Gaudray, G., Thebault, S., Basbous, J., Koffi, J.A., Devaux, C. and Mesnard, J. (2001) The cAMP response element binding protein-2 (CREB-2) can interact with the C/EBP-homologous protein (CHOP). *FEBS Lett.*, **502**, 57–62.
24. Podust, L.M., Poulos, T.L. and Waterman, M.R. (2001) Crystal structure of cytochrome P450 14alpha-sterol demethylase (CYP51) from *Mycobacterium tuberculosis* in complex with azole inhibitors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **98**, 3068–3073.
25. Hai, T. and Curran, T. (1991) Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **88**, 3720–3724.
26. Vinson, C.R., Hai, T. and Boyd, S.M. (1993) Dimerization specificity of the leucine zipper-containing bZIP motif on DNA binding: prediction and rational design. *Genes Dev.*, **7**, 1047–1058.
27. Gachon, F., Thebault, S., Peleraux, A., Devaux, C. and Mesnard, J.M. (2000) Molecular interactions involved in the transactivation of the human T-cell leukemia virus type 1 promoter mediated by Tax and CREB-2 (ATF-4). *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 3470–3481.
28. Liang, G. and Hai, T. (1997) Characterization of human activating transcription factor 4, a transcriptional activator that interacts with multiple domains of cAMP-responsive element-binding protein (CREB)-binding protein. *J. Biol. Chem.*, **272**, 24088–24095.
29. Lassot, I., Estrabaud, E., Emiliani, S., Benkirane, M., Benarous, R. and Margottin-Goguet, F. (2005) p300 modulates ATF4 stability and transcriptional activity independently of its acetyltransferase domain. *J. Biol. Chem.*, **280**, 41537–41545.
30. De Angelis, R., Iezzi, S., Bruno, T., Corbi, N., Di Padova, M., Floridi, A., Fanciulli, M. and Passananti, C. (2003) Functional interaction of the subunit 3 of RNA polymerase II (RPB3) with transcription factor-4 (ATF4). *FEBS Lett.*, **547**, 15–19.
31. Tontonoz, P., Hu, E. and Spiegelman, B.M. (1994) Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell*, **79**, 1147–1156.
32. Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M. and Seraphin, B. (2001) The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods*, **24**, 218–229.
33. Lipson, K.E. and Baserga, R. (1989) Transcriptional activity of the human thymidine kinase gene determined by a method using the polymerase chain reaction and an intron-specific probe. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **86**, 9774–9777.
34. Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M. and Seraphin, B. (1999) A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat. Biotechnol.*, **17**, 1030–1032.
35. Sterner, D.E. and Berger, S.L. (2000) Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **64**, 435–459.
36. Song, C.Z., Keller, K., Murata, K., Asano, H. and Stamatiou, G. (2002) Functional interaction between coactivators CBP/p300, PCAF, and transcription factor FKLTF2. *J. Biol. Chem.*, **277**, 7029–7036.
37. Marmorstein, R. (2001) Structure of histone acetyltransferases. *J. Mol. Biol.*, **311**, 433–444.
38. Yang, X.J., Ogryzko, V.V., Nishikawa, J., Howard, B.H. and Nakatani, Y. (1996) A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature*, **382**, 319–324.
39. Berger, S.L. (2002) Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **12**, 142–148.
40. Blanco, J.C., Minucci, S., Lu, J., Yang, X.J., Walker, K.K., Chen, H., Evans, R.M., Nakatani, Y. and Ozato, K. (1998) The histone acetylase PCAF is a nuclear receptor coactivator. *Genes Dev.*, **12**, 1638–1651.
41. Korzus, E., Torchia, J., Rose, D.W., Xu, L., Kurokawa, R., McInerney, E.M., Mullen, T.M., Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G. (1998) Transcription factor-specific requirements for coactivators and their acetyltransferase functions. *Science*, **279**, 703–707.
42. Xu, L., Lavinsky, R.M., Dasen, J.S., Flynn, S.E., McInerney, E.M., Mullen, T.M., Heinzel, T., Szeto, D., Korzus, E. *et al.* (1998) Signal-specific co-activator domain requirements for Pit-1 activation. *Nature*, **395**, 301–306.
43. Puri, P.L., Sartorelli, V., Yang, X.J., Hamamori, Y., Ogryzko, V.V., Howard, B.H., Kedes, L., Wang, J.Y., Graessmann, A. *et al.* (1997) Differential roles of p300 and PCAF acetyltransferases in muscle differentiation. *Mol. Cell*, **1**, 35–45.
44. Schiltz, R.L., Mizzen, C.A., Vassilev, A., Cook, R.G., Allis, C.D. and Nakatani, Y. (1999) Overlapping but distinct patterns of histone acetylation by the human coactivators p300 and PCAF within nucleosomal substrates. *J. Biol. Chem.*, **274**, 1189–1192.
45. Sartorelli, V., Puri, P.L., Hamamori, Y., Ogryzko, V., Chung, G., Nakatani, Y., Wang, J.Y. and Kedes, L. (1999) Acetylation of MyoD directed by PCAF is necessary for the execution of the muscle program. *Mol. Cell*, **4**, 725–734.
46. Martinez-Balbas, M.A., Bauer, U.M., Nielsen, S.J., Brehm, A. and Kouzarides, T. (2000) Regulation of E2F1 activity by acetylation. *EMBO J.*, **19**, 662–671.

47. Giandomenico, V., Simonsson, M., Gronroos, E. and Ericsson, J. (2003) Coactivator-dependent acetylation stabilizes members of the SREBP family of transcription factors. *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 2587–2599.
48. Madison, D.L., Yaciuk, P., Kwok, R.P. and Lundblad, J.R. (2002) Acetylation of the adenovirus-transforming protein E1A determines nuclear localization by disrupting association with importin- $\alpha$ . *J. Biol. Chem.*, **277**, 38755–38763.
49. Gachon, F., Devaux, C. and Mesnard, J.M. (2002) Activation of HTLV-I transcription in the presence of Tax is independent of the acetylation of CREB-2 (ATF-4). *Virology*, **299**, 271–278.
50. Jin, Y., Zeng, S.X., Lee, H. and Lu, H. (2004) MDM2 mediates p300/CREB-binding protein-associated factor ubiquitination and degradation. *J. Biol. Chem.*, **279**, 20035–20043.
51. Sano, Y., Tokitou, F., Dai, P., Maekawa, T., Yamamoto, T. and Ishii, S. (1998) CBP alleviates the intramolecular inhibition of ATF-2 function. *J. Biol. Chem.*, **273**, 29098–29105.
52. Kawasaki, H., Song, J., Eckner, R., Ugai, H., Chiu, R., Taira, K., Shi, Y., Jones, N. and Yokoyama, K.K. (1998) p300 and ATF-2 are components of the DRF complex, which regulates retinoic acid- and E1A-mediated transcription of the c-jun gene in F9 cells. *Genes Dev.*, **12**, 233–245.

**TRB3 inhibits the transcriptional activation of stress-regulated genes by a negative feedback on the ATF4 pathway.**

Jousse C, Deval C, Maurin AC, Parry L, Chérasse Y, **Chaveroux C**, Lefloch R, Lenormand P, Bruhat A, Fafournoux P.

J Biol Chem. 2007 May 25;282(21):15851-61

# TRB3 Inhibits the Transcriptional Activation of Stress-regulated Genes by a Negative Feedback on the ATF4 Pathway\*

Received for publication, December 21, 2006, and in revised form, March 15, 2007. Published, JBC Papers in Press, March 16, 2007, DOI 10.1074/jbc.M611723200

Céline Jousse<sup>†1</sup>, Christiane Deval<sup>†1</sup>, Anne-Catherine Maurin<sup>‡</sup>, Laurent Parry<sup>‡</sup>, Yoan Chérasse<sup>‡</sup>, Cédric Chaveroux<sup>‡</sup>, Renaud Lefloch<sup>§</sup>, Philippe Lenormand<sup>§</sup>, Alain Bruhat<sup>‡</sup>, and Pierre Fafournoux<sup>‡2</sup>

From the <sup>†</sup>UMR 1019, Unité Nutrition Humaine, INRA de Theix, 63122 St Genès Champanelle, France and the <sup>§</sup>Institute of Signaling, Developmental Biology and Cancer Research, CNRS-UMR 6543, Centre Antoine Lacassagne, 06100 Nice, France

The integrated stress response (ISR) is defined as a highly conserved response to several stresses that converge to the induction of the activating transcription factor 4 (ATF4). Because an uncontrolled response may have deleterious effects, cells have elaborated several negative feedback loops that attenuate the ISR. In the present study, we describe how induction of the human homolog of *Drosophila tribbles* (TRB3) attenuates the ISR by a negative feedback mechanism. To investigate the role of TRB3 in the control of the ISR, we used the regulation of gene expression by amino acid limitation as a model. The enhanced production of ATF4 upon amino acid starvation results in the induction of a large number of target genes like CHOP (CAAT/enhancer-binding protein-homologous protein), asparagine synthetase (ASNS), or TRB3. We demonstrate that TRB3 overexpression inhibits the transcriptional induction of CHOP and ASNS whereas TRB3 silencing induces the expression of these genes both under normal and stressed conditions. In addition, transcriptional profiling experiments show that TRB3 affects the expression of many ISR-regulated genes. Our results also suggest that TRB3 and ATF4 belong to the same protein complex bound to the sequence involved in the ATF4-dependent regulation of gene expression by amino acid limitation. Collectively, our data identify TRB3 as a negative feedback regulator of the ATF4-dependent transcription and participates to the fine regulation of the ISR.

Cells have evolved specific signaling pathways to ensure adaptation to stress. For example, the integrated stress response (ISR),<sup>3</sup> which is highly conserved from yeast to mammals, integrates signaling from multiple stress pathways. The ISR acts downstream of the eukaryotic translation initiation

factor 2 (eIF2 $\alpha$ ) phosphorylation (1–4). In mammals, distinct stress signals activate four eIF2 $\alpha$  kinases: PKR (activated by double-stranded RNA during viral infection (5)), GCN2 (activated by uncharged tRNAs, adapts cells to amino acid starvation (6, 7)), HRI (activated by heme deficiency (8)) and PERK (activated by protein load in the endoplasmic reticulum, ER stress (9)). The reversible phosphorylation on serine 51 of eIF2 $\alpha$  by either of these kinases inhibits initiation of mRNA translation. Although global protein synthesis is inhibited, the translation of specific mRNAs such as ATF4 is strongly induced (4). This transcription factor plays a crucial role for the adaptation to stresses by regulating the expression of many genes. As shown by Harding *et al.* (1), ATF4 controls many genes involved in metabolism and transport of amino acid and in resistance to oxidative stress. In addition, several ATF4 target genes, such as CHOP, are themselves transcription factors that regulate the expression of a set of stress-induced target genes and amplify the signal initiated by the original stress (10–12).

Because an uncontrolled response to stress may have deleterious effects, cells have elaborated a negative feedback loop that attenuates the ISR. Indeed, in response to stresses, the induction of GADD34 mediates eIF2 $\alpha$  dephosphorylation and allows protein synthesis to recover to translate the product of induced genes (13, 14). These observations indicate that GADD34 controls a programmed shift from translational repression to stress-induced gene expression and reconciles the apparent contradiction between the translational and transcriptional arms of cellular stress responses.

In a context of amino acid starvation, it has been shown that the expression of many genes is induced via the GCN2/ATF4 pathway. For two genes (CHOP and ASNS), a cis-acting element involved in the transcriptional activation by leucine starvation was well characterized and has been respectively named AARE (amino acid response element) (15) and NSRE (nutrient-sensing response element) (16). Previous data from our laboratory (17) and others (18, 19) have shown that these elements are able to bind ATF4.

Among the mRNA species that are induced by amino acid limitation, the highest induction ratio was obtained for TRB3, the mammalian homolog of *Drosophila tribbles*, also known as TRIB3, NIPK, SINK, or SKIP3. An emerging literature suggests that this ubiquitously expressed protein has a scaffold-like regulatory function for a number of signaling pathways. Several reports described TRB3 as a regulatory protein for p53/RelA

\* The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

<sup>2</sup> To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-4-73-62-45-62; Fax: 33-4-73-62-47-55; E-mail: fpierre@clermont.inra.fr.

<sup>3</sup> The abbreviations used are: ISR, integrated stress response; AARE, amino acid response element; ASNS, asparagine synthetase; ATF, activating transcription factor; CHOP, C/EBP homologous protein; MEF, mouse embryonic fibroblast; qRT-PCR, quantitative reverse transcriptase-PCR; NSRE, nutrient sensing response element; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; ChIP, chromatin immunoprecipitation assay; PBS, phosphate-buffered saline; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; ER, endoplasmic reticulum; DTT, dithiothreitol.



## TRB3 Inhibits ATF4-dependent Transcription

and ATF4. Wu *et al.* (20) showed that TRB3 is critically involved in a negative feedback control pathway of  $\text{Nf-}\kappa\text{B}$ -induced gene expression through the p65/RelA regulation. Another set of publications showed that TRB3 interacts with ATF4 and inhibits the transcriptional activity of overexpressed ATF4 (21, 22). In addition, a recent study supports the potential regulatory role of TRB3 under stressful conditions by demonstrating that cellular stresses can both up- and down-regulate TRB3 expression (23). The functional relevance of TRB3 induction during stress has been studied by Ohoka *et al.* (24) who demonstrated that TRB3 is involved in the coordination of programmed cell death during ER stress. A second line of investigation on TRB3 functions comes from Montminy's laboratory that showed that TRB3 is involved in the control of both glucose and lipid metabolisms (25, 26). Indeed, they show that: 1) TRB3 inhibits Akt activation, 2) its level is elevated during fasting (27), 3) an adenovirus-mediated expression of TRB3 in mice leads to alteration in glucose metabolism. Thus, these authors propose that TRB3 serves as a major modulatory mechanism in the balance of glucose metabolism (25). Recently, the same group demonstrated that TRB3 stimulates lipolysis by triggering the degradation of ACC (acetyl coA carboxylase) in adipose tissue and that transgenic mice overexpressing TRB3 in adipose tissue were protected from diet-induced obesity (26).

Taken together, published data demonstrate that TRB3 is up-regulated by many effectors and is involved in the fine control of several signaling pathways. In the context of amino acid regulation of gene expression, we investigated the role of TRB3 in the regulation of the ISR. We demonstrate that TRB3 is a negative feedback regulator of ATF4-regulated transcription and participates to the fine regulation of the amino acid response pathway and more generally of the ISR.

### EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Cell Culture and Treatment Conditions**—All cells were cultured at 37 °C/CO<sub>2</sub> 5% in Dulbecco's modified Eagle's medium F12 (DMEM F12) (Sigma) containing 10% fetal bovine serum. Parental cell line, *i.e.* HeLa cells overexpressing Tet-repressor, were cultured in presence of 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Blasticidine and tet-TRB3myc cells in presence of 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  blasticidine + 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  zeocine. When needed, tetracycline was used for 16 h at 0.1  $\mu\text{M}$ . When indicated, DMEM F12 lacking leucine was used. In all experiments involving amino acid starvation, 10% dialyzed calf serum was used. Mouse embryonic fibroblasts (MEF) deficient in ATF4 were kindly given by Dr. D. Ron (NYU, New York) (1).

**DNA Transfection and Luciferase Assay**—Cells were plated in 12-well dishes and transfected by the calcium phosphate coprecipitation method as described previously (15). Unless otherwise indicated, 1  $\mu\text{g}$  of luciferase plasmid was transfected into the cells along with 0.1  $\mu\text{g}$  of pCMV- $\beta\text{Gal}$ , a plasmid carrying the bacterial  $\beta$ -galactosidase gene fused to the human cytomegalovirus immediate-early enhancer/promoter region, as an internal control. Cells were then exposed to the precipitate for 16 h, washed twice in phosphate-buffered saline (PBS), and then incubated with DMEM F12 containing 10% calf serum. Twenty-four hours after transfection, cells were amino acid -starved for 16 h. Cells were then harvested and luciferase

and  $\beta$ -galactosidase activity was measured as previously described (28). Relative luciferase activity was given as the ratio of relative luciferase unit/relative  $\beta$ -gal unit.

**Plasmid Constructions**—2xARE.TK.Luciferase and NSRE1 + NSRE2.TK.Luciferase plasmids were generated as previously described (29). pCDNA4.TO.TRB3-FL.Myc.6xHIS plasmid was generated by cloning the full-length coding sequence of TRB3 in frame with the Myc and His tags of the pCDNA4.TO.Myc.6xHIS vector (Invitrogen). pBIND.Gal4-ATF4-(1–85), pBIND.Gal4-ATF4-(1–186) and pBIND.Gal4-ATF4-(86–186) were obtained by inserting ATF4 coding sequence (amino acids 1–85, amino acids 1–186, and amino acids 86–186, respectively), in-frame with the Gal4 coding sequence in the pBIND vector (Promega).

**Analysis of Gene Expression Using Real Time RT-PCR**—Total RNA was prepared as previously described (30) and treated with DNase I, Amp Grade (Invitrogen) prior to cDNA synthesis. RNA integrity was electrophoretically verified by ethidium bromide staining. RNA (0.5  $\mu\text{g}$ ) was reverse-transcribed with 100 units of Superscript II plus RNase H<sup>−</sup> Reverse Transcriptase (Invitrogen) using 100  $\mu\text{M}$  random hexamer primers (Amersham Biosciences), according to the manufacturer's instructions. Primers for mouse sequences (used in ATF4<sup>+/+</sup>, ATF4<sup>−/−</sup> MEFs): *CHOP* (forward primer, 5'-CCTAGCTTGGCTGACAGAGG-3'; reverse primer, 5'-CTGCTCCTTCTCCTTCATGC-3'), *ASNS* (forward primer, 5'-TACAACCACAAGGCGCTACA-3'; reverse primer, 5'-AAGGGCCTGACTCCATAGGT-3'), *TRB3* (forward primer, 5'-CAGGAAGAAACCGTTGAGTT-3'; reverse primer, 5'-TTGCTCTCGTTCCAAAAGGA-3') and primers for human sequences (used in HeLa cells and their derivatives): *CHOP* (forward primer, 5'-CAGAACCAGCAGAGGTCACA-3'; reverse primer, 5'-AGCTGTGCCACTTTCCTTTC-3'), *ASNS* (forward primer, 5'-ATCACTGTCGGGATGTACCC-3'; reverse primer, 5'-CTTCAACAGAGTGGCAGCAA-3'), *TRB3* (forward primer, 5'-TGGTACCCAGCTCCTCTACG-3'; reverse primer, 5'-GACAAAGCGACACAGCTTGA-3') were used and yielded PCR products of approximately 200 bp in size. To control for RNA quality and cDNA synthesis,  $\beta$ -actin mRNA was also amplified (mouse: forward primer, 5'-TACAGCTTCACCACCACAGC-3'; reverse primer 5'-AAGGAAGGCTGGAAAAGAGC-3'; human: forward primer, 5'-CTCGCAGGTCAAGAGCAAG-3'; reverse primer 5'-GACAGCTGCTCCACCTTCTT-3'). Real-time quantitative PCR was carried out using a LightCycler<sup>TM</sup> System (Roche Applied Science) as described previously (17). Relative results were displayed as relative levels of *CHOP*, *ASNS*, or *TRB3* per  $\beta$ -actin.

**Antibodies**—The ATF4 sc-200 antibody, purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc, was used for ChIP and immunoblot experiments. The TRB3 antibody was purchased from Calbiochem, the c-Myc antibody was from Sigma, and the  $\beta$ -actin antibody was from Santa Cruz Biotechnology, Inc.

The antibodies used for acetylated histone immunoprecipitation were acetylated histone H3, 06-599 that recognizes acetylated H3 at Lys-9 and Lys-14 and acetylated histone H4, 06-866 that recognizes acetylated H4 at Lys-5, -8, -12, and -16 from Upstate Biotechnology (Charlottesville, VA).

**Immunoblot Analysis**—Nuclear extracts for the detection of ATF4, mouse TRB3, and Myc-tagged TRB3 were obtained as follows: Cells were lysed for 5 min at 4 °C in Harvest buffer (10 mM HEPES pH 7.9, 50 mM NaCl, 0.5 M sucrose, 0.1 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 1 mM dithiothreitol, 1 mM PMSF, protease inhibitor cocktails from Sigma). Intact nuclei were pelleted at 1000 rpm then washed in 500  $\mu$ l of buffer A (10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, protease inhibitor cocktails from Sigma). Nuclei pellets were then lysed 15 min at 4 °C in Buffer C (10 mM HEPES pH 7.9, 500 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 0.1% Nonidet P-40, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, protease inhibitor cocktails from Sigma). Whole cell extracts for the detection of human TRB3 were obtained by lysis for 15 min on ice in radioimmune precipitation assay buffer (10 mM Tris, pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM PMSF, protease inhibitor cocktails from Sigma). 20–50  $\mu$ g of proteins were resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto a nitrocellulose membrane. Protein loading was controlled by Ponceau staining. Membranes were incubated in blocking solution (5% nonfat milk powder in PBS, 0.02% Tween) for 1 h at room temperature. The blots were then incubated with primary antibody in blocking solution overnight at 4 °C. Antibodies were diluted according to the manufacturer's instructions. The blots were washed three times in PBS 0.02% Tween and incubated with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated antibody (1:10000) from Cell Signaling Technology in blocking buffer for 1 h at room temperature. After three washes in PBS 0.02% Tween, the blots were developed using the enhanced chemiluminescence (ECL) detection system (Amersham Biosciences).

**ChIP Analysis**—ChIP analyses were performed according to the protocol of Upstate Biotechnology, Inc. with minor modifications (31). Cells were seeded at  $1 \times 10^6$ /100-mm dish with DMEM F12 and grown for 24 h. Cells were transferred to fresh DMEM F12 12 h before transfer to either complete DMEM F12 or DMEM F12 lacking leucine for the time period indicated in each figure. Protein-DNA cross-link was performed by adding formaldehyde directly to the culture medium to a final concentration of 1% and then stopped 8 min later by the addition of glycine to a final concentration of 0.125 M. Cross-linked chromatin was sonicated using a Vibra cell sonicator (Biolock Scientific Technology) for ten bursts of 30 s at power 2 with 1 min cooling on ice between each burst. Extracts from  $1 \times 10^6$  HeLa cells or MEF were incubated with 5  $\mu$ g of antibody. The antibody-bound complex was precipitated by protein A-agarose beads (Upstate Biotechnology). The DNA fragments in the immunoprecipitated complex were released by reversing the cross-linking overnight at 65 °C and purified using a phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation. Real-time quantitative PCR was performed by using a LightCycler (Roche Applied Science) and a SYBR-Green-I-containing PCR mix (Qiagen), following the recommendations of the manufacturer. The immunoprecipitated material was quantified relative to a standard curve of HeLa or MEF genomic DNA. Primers used were the following: human *CHOP AARE*, 5'-AAGAGGCTCAGACCGACTA-3' and 5'-ATGATGCAATGTTTGGCAAC-3'; mouse *CHOP AARE* (amplicon B), 5'-GGGCAGACAAGT-

TCAGGAAG-3' and 5'-ATGATGCAATGTTTGGCAAC-3'; mouse *CHOP* amplicon A, 5'-TCCCCAAGAGAACAAACACC-3', and 5'-CGGACCTGACATTCCTGACT-3'; mouse *CHOP* amplicon C, 5'-TAGAAGGGAGAGGCTGAGCA-3' and 5'-CCAATGGCTTCCTGTTTCAT-3'; mouse *ASNS* NSRE, 5'-CAGAACACCTCCTGGCTCTC-3' and 5'-CCGC-TTGCCACCTTAGAGT-3'; human *ASNS* NSRE, 5'-AACAA-AAGAGCTCCTCCTTGC-3' and 5'-AGGGATGTGGACAGCTTGAC-3'. The reactions were incubated at 95 °C for 15 min to activate the polymerase, followed by amplification at 95 °C for 15 s, 55 °C for 20 s and 72 °C for 20 s for 45 cycles. After PCR, melting curves were acquired by stepwise increases in the temperature from 65 to 95 °C to ensure that a single product was amplified in the reaction. The results are expressed as the ratio to input DNA. Samples are the means from at least three independent immunoprecipitations.

**Sequential ChIP Analysis**—The chromatin extraction and the first immunoprecipitation were performed as described in the previous paragraph. The immunoprecipitated samples were incubated for 5 min at 65 °C in elution buffer (0.1 M NaHCO<sub>3</sub>, 1% SDS), and the supernatants were used for a second immunoprecipitation.

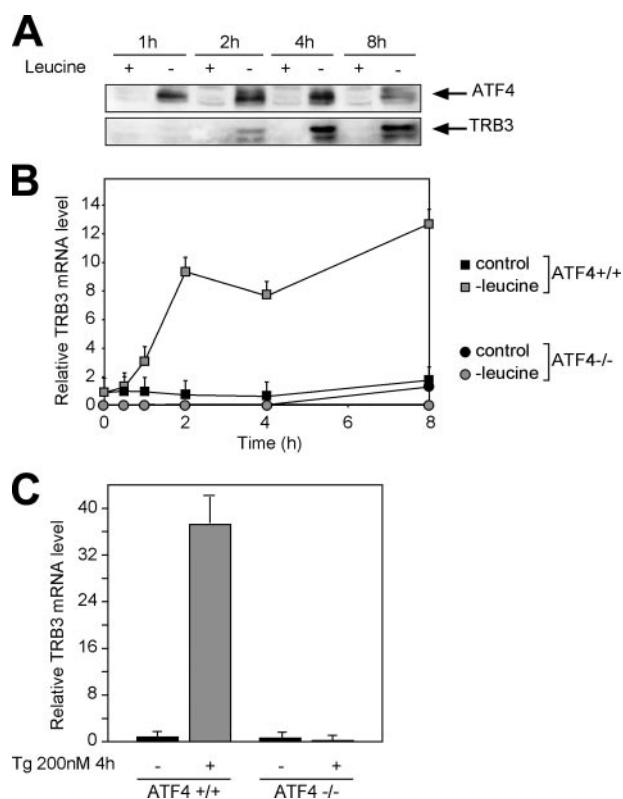
**siRNA Preparation and Transfection**—siRNA corresponding to human TRB3 mRNA (5'-CGCUGACCGUGAGAGGAAGdTdT-3' and 5'-CUUCCUCUCACGGUCAGCGdTdT-3') were designed. A control siRNA (5'-CGCUGACCGUGAAAGdTdT-3' and 5'-CUUUCUUUCACGGUCAGCGdTdT-3') was used as a negative control. siRNA experiments were performed as described previously (17). Cells were plated in 6-well plates and transfected 24 h later with 2  $\mu$ g of siRNA and 1  $\mu$ g of luciferase reporter plasmid when applicable, using the calcium phosphate precipitation. 24 h post-transfection, cells are incubated in either DMEM or leucine-free DMEM for 4 or 16 h then harvested either for luciferase assays or for analysis of gene expression using qRT-PCR, as described above.

**Microarray Experiments**—Total RNA from either MEFs cells (ATF4<sup>+/+</sup> or ATF4<sup>-/-</sup> cells), parental cell line or tet-TRB3myc cells were isolated using RNeasy mini kit (Qiagen). cRNA targets were synthesized and hybridized according to the manufacturer's instructions (Agilent). Mouse microarrays were provided from Réseau National des Génomies (Evry, France) and human microarrays were from Agilent Technology. The slides were scanned with an Affimetrix 428 scanner (Affimetrix, Santa Clara, CA) using appropriate gains on the photomultiplier (PMT) to obtain the highest intensity without saturation. Gene expression values were background corrected and normalized using the Genepix software and Lowess normalization. We used a Student's *t* test with Bonferroni adjustment (with a *p* value of <0.01) and a ratio cut-off of >2 to identify genes differentially expressed by leucine starvation in ATF4<sup>+/+</sup> and tet-TRB3myc cells.

## RESULTS

**TRB3 Induction following Amino Acid Starvation Is ATF4-dependent**—To better define the role of the GCN2/ATF4 pathway, we screened genes induced by amino acid starvation. In our experimental conditions, TRB3 has been identified as the most induced transcript following amino acid





**FIGURE 1. Induction of TRB3 mRNA by leucine starvation.** A, MEF cells were incubated either in DMEM/F12 (+leucine) or in DMEM/F12 lacking leucine (–leucine) and harvested after the indicated incubation times. Nuclear extracts were prepared, and immunoblots against ATF4 and TRB3 were performed as described under “Experimental Procedures.” B, ATF4<sup>+/+</sup> or ATF4<sup>-/-</sup> cells were incubated either in DMEM/F12 (control, black dots, or squares) or in DMEM/F12 lacking leucine (–leucine, gray dots or squares) and harvested after the indicated incubation times. Total RNA was extracted and qRT-PCR was performed as described under “Experimental Procedures.” C, ATF4<sup>+/+</sup> or ATF4<sup>-/-</sup> cells were incubated in DMEM/F12 containing (gray bars) or not (black bars) 200 nM thapsigargin, and harvested after 4 h. Total RNA was extracted, and qRT-PCR was performed as described under “Experimental Procedures.”

starvation (data not shown). To better characterize the regulation of TRB3 by amino acid starvation, we first analyzed the kinetic of TRB3 expression in response to leucine starvation. Wild-type mouse embryonic fibroblasts (MEFs) were incubated in either DMEM (control medium) or leucine-free DMEM (leucine-free medium) for 1–8 h and the protein level of TRB3 was measured by Western blot. TRB3 was not detected in control cells but was induced following a leucine starvation for 2–8 h (Fig. 1A). TRB3 induction by amino acid starvation is not restricted to MEF cells nor to leucine starvation since it was observed in different cell lines and for different essential amino acids limitation (data not shown).

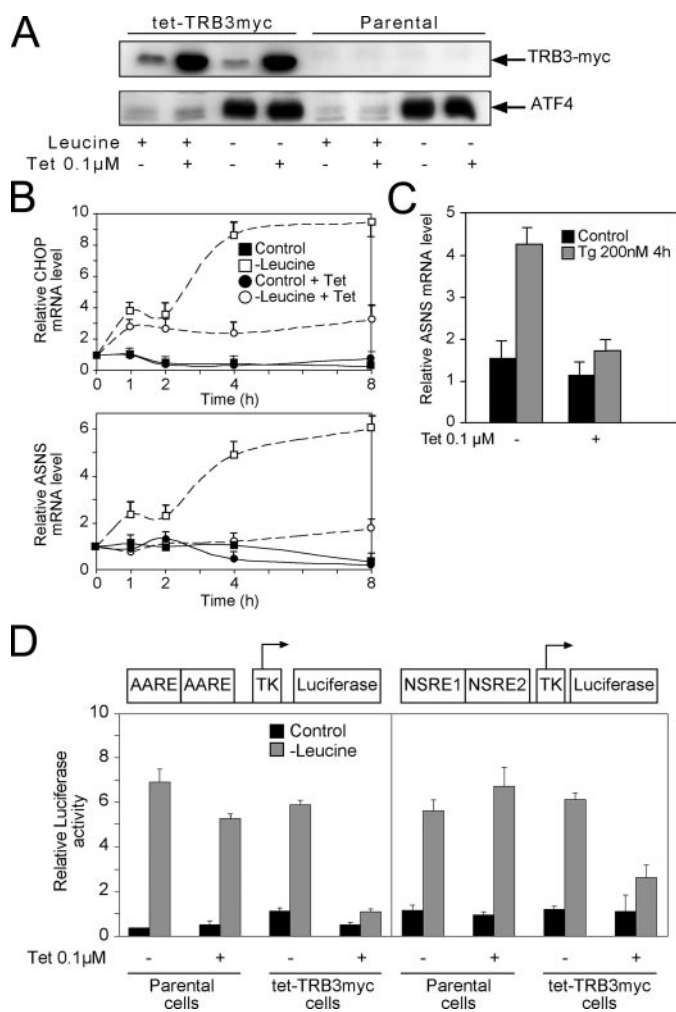
The expression of TRB3 protein was delayed compared with that of ATF4, consistent with the hypothesis that TRB3 is downstream of ATF4. To investigate the dependence of TRB3 toward ATF4, the TRB3 mRNA level was measured by quantitative RT-PCR after leucine starvation, in ATF4<sup>+/+</sup> or ATF4<sup>-/-</sup> MEFs (Fig. 1B). TRB3 mRNA accumulation was detectable as soon as 1 h after leucine starvation in ATF4<sup>+/+</sup> cells and reached a plateau after 2 h. In ATF4<sup>-/-</sup> cells, the steady state level of TRB3 mRNA was undetectable, furthermore no induction was observed following leucine starvation.

Because TRB3 induction following amino acid starvation was found to be entirely ATF4-dependent, we checked whether another stress known to induce ATF4, was also able to induce TRB3. For that purpose ATF4<sup>+/+</sup> or ATF4<sup>-/-</sup> MEFs were treated for 4 h with 200 nM thapsigargin, a drug causing an ER stress. Thapsigargin also strongly induced TRB3 mRNA in ATF4<sup>+/+</sup> cells whereas no induction was observed in ATF4<sup>-/-</sup> cells (Fig. 1C).

**Overexpression of TRB3 Inhibits CHOP and ASNS Induction by Leucine Starvation**—Ord *et al.* (21) have shown that TRB3 interacts with ATF4 and inhibits ATF4 transcriptional activity measured by using reporter gene assays. To investigate the role of TRB3 on the regulation of gene expression by amino acid starvation, a TRB3-inducible cell line was generated. HeLa cells expressing the Tet-repressor were transfected with a plasmid (pCDNA4.TO.TRB3-FL.Myc.6xHIS) containing an in-frame C-terminal fusion of human TRB3 with a peptide encoding the c-myc epitope and a polyhistidine (His<sub>6</sub>) tag, driven by a hybrid promoter consisting of the human cytomegalovirus immediate-early (CMV) promoter and tetracycline operator 2 (TetO2) sites. The Zeocin-resistant stable cell line obtained was subsequently named “tet-TRB3myc” cell line. Tet-TRB3myc cell line and its parental counterpart were pretreated or not for 16 h with 0.1  $\mu$ M tetracycline and then incubated in either control or leucine-free medium for 4 h. A Western blot analysis showed that a Myc-tagged-TRB3 was strongly expressed following a tetracycline treatment in the presence or absence of leucine in the tet-TRB3myc cell line, whereas no tagged protein was observed in the parental cell line (Fig. 2A). Because tetracycline could interfere with the protein synthesis machinery, we made sure that 0.1  $\mu$ M tetracycline for 16 h did not affect ATF4 expression in both parental and tet-TRB3myc cells. Finally, using an antibody specific for human TRB3, we showed that the level of TRB3-Myc overexpression upon tetracycline induction and the endogenous TRB3 level observed after amino acid starvation were expressed at the same magnitude (data not shown). This observation indicates that the effects of TRB3 induction are physiologic and not pharmacologic.

To determine whether TRB3 could affect the induction of genes known to be induced by amino acid starvation in a GCN2/ATF4-dependent way, we measured, by quantitative RT-PCR, CHOP and ASNS mRNA levels in tet-TRB3myc cells. In the experiment described in Fig. 2B, tet-TRB3myc cells were pretreated or not for 16 h with 0.1  $\mu$ M tetracycline and then incubated in either control or leucine-free medium for 1–8 h. We found that CHOP mRNA was induced up to 9-fold following leucine starvation in untreated cells, whereas in cells treated with tetracycline (*i.e.* overexpressing TRB3), the induction by leucine starvation was strongly reduced (induction ratio <3). The results were even clearer for ASNS mRNA, whose induction by leucine starvation was completely abolished by TRB3 overexpression. This difference in sensitivity toward TRB3 between CHOP and ASNS could be explained by the existence of other mechanisms that may regulate CHOP expression in response to leucine starvation (*i.e.* mRNA stabilization) (15).

Because the ISR can be turned-on in response to various stimuli, we checked the effects of TRB3 on ASNS expression in cells submitted to an ER stress. Fig. 2C shows that ASNS induc-



**FIGURE 2. Overexpression of TRB3 inhibits CHOP and ASNS induction by leucine starvation.** A, characterization of the tet-TRB3myc cell line: parental or tet-TRB3myc cells were pretreated in DMEM  $\pm$  tetracycline 0.1  $\mu$ M for 16 h, then incubated in DMEM/F12 (+leucine) or in DMEM/F12 lacking leucine (-leucine) and harvested after 4 h. Nuclear extracts were prepared and immunoblot against ATF4 (bottom panel) and Myc (top panel) were performed as described under "Experimental Procedures." B, tet-TRB3myc cells were pre-treated in DMEM  $\pm$  tetracycline 0.1  $\mu$ M for 16 h (white or black dots), then incubated in DMEM/F12 (+leucine, black dots or squares) or in DMEM/F12 lacking leucine (-leucine, white dots or square) and harvested after the indicated incubation times. Total RNA was extracted, and qRT-PCR was performed as described under "Experimental Procedures." C, tet-TRB3myc cells were pretreated in DMEM  $\pm$  tetracycline 0.1  $\mu$ M for 16 h, then incubated in DMEM/F12 (control, black bars) or in DMEM/F12 containing 200 nM thapsigargin (Tg, gray bars) and harvested after 4 h. Total RNA was extracted, and qRT-PCR was performed as described under "Experimental Procedures." D, parental or tet-TRB3myc cells were transfected with a reporter plasmid containing either 2 copies of the CHOP AARE (-313 to -295) inserted 5' to the TK promoter driving luciferase gene (2xAARE.TK.Luc) or ASNS NSRE1 + NSRE2 inserted 5' to the TK promoter driving luciferase gene (NSRE1 + 2.TK.Luc). Sixteen hours post-transfection, cells were pretreated in DMEM  $\pm$  tetracycline 0.1  $\mu$ M for 8 h, then incubated in DMEM/F12 (Control  $\pm$  Tet 0.1  $\mu$ M, black bars) or in DMEM/F12 lacking leucine (-leucine  $\pm$  Tet 0.1  $\mu$ M, gray bars) and harvested after 16 h for preparation of cell extracts and determination of luciferase activity as described under "Experimental Procedures."

tion by thapsigargin was abolished when TRB3 was overexpressed. In this experiment we did not measure CHOP expression because, in addition to the ATF4 pathway, ER stress activates other signaling processes regulating CHOP transcription (two ERSE (ER stress element) have been characterized in the CHOP promoter) making the results difficult to interpret.

Taken together, the results presented in Fig. 2, B and C show that TRB3 overexpression inhibits the mRNA accumulation of CHOP and ASNS in response to amino acid starvation or ER stress.

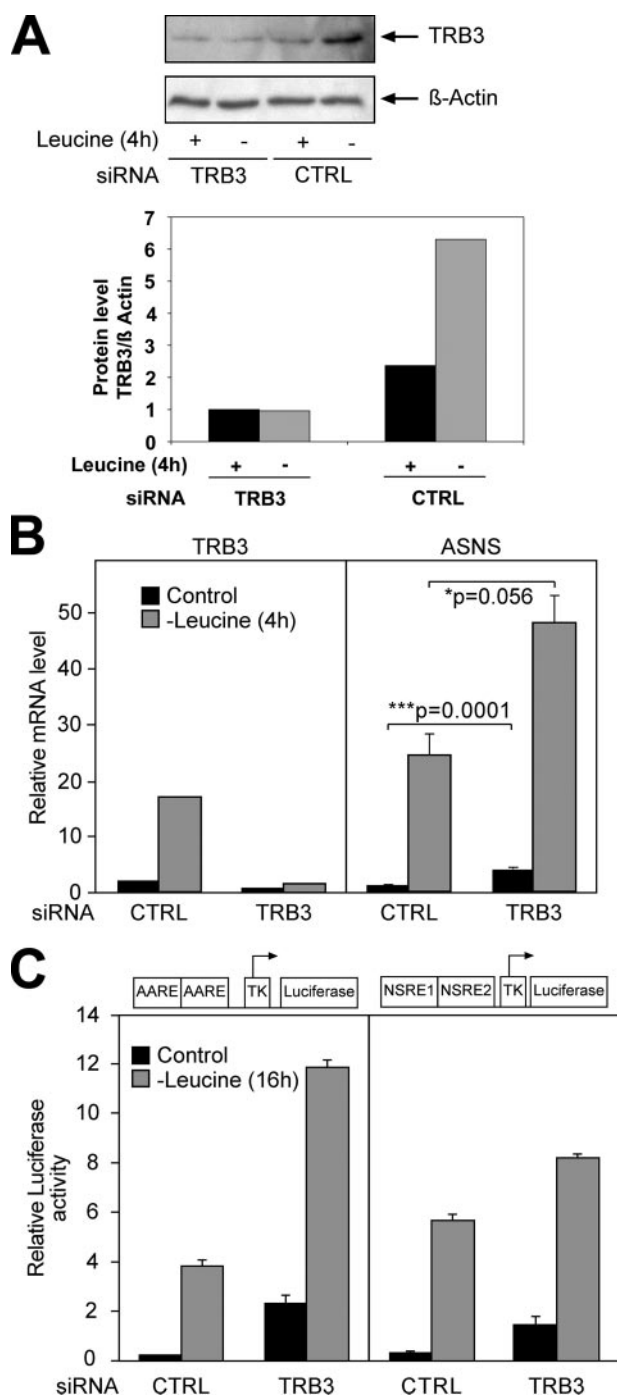
To investigate whether the inhibitory effect of TRB3 acts by regulating the AARE-dependent transcription, we studied the regulation of a luciferase reporter gene driven by a minimum TK promoter flanked by 2 copies of either AARE (2xAARE.TK.Luciferase) or 1 copy of each NSRE (NSRE1 + NSRE2.TK.Luciferase). These constructs were transiently transfected into tet-TRB3myc or into parental cells and the luciferase expression was measured in response to 16-h leucine starvation in the presence or not of tetracycline (Fig. 2D). As previously observed, leucine starvation strongly induced both AARE and NSRE1 + 2 transcriptional activity in untreated cells. In contrast, when TRB3 was ectopically induced by tetracycline treatment, little to no induction was observed. These data show that TRB3-dependent inhibition of CHOP and ASNS expression is the consequence of the inhibition of the AARE-dependent transcription.

**Inhibition of TRB3 Potentiates ATF4 Target Gene Induction by Leucine Starvation**—We formulated the hypothesis that a shut down of TRB3 by RNAi would lead to an overinduction of ATF4 target genes expression upon leucine starvation. First, we checked the efficiency of the TRB3 RNAi by Western blot (Fig. 3A) and qRT-PCR (Fig. 3B, first panel) in control and leucine-starved cells. HeLa cells were transfected either with TRB3 RNAi or Control RNAi, then incubated in either control or leucine-free medium for 16 h. Fig. 3, A and B shows that TRB3 was strongly induced by leucine starvation in cells treated by Control RNAi, whereas both basal and induced level of TRB3 were strongly diminished in cells treated with TRB3 RNAi. In the same experiment, we then measured ASNS mRNA and found that both basal and induced (leucine starvation) levels of ASNS were increased (respectively 4 and 2 times) when cells were treated with TRB3 RNAi compared with control RNAi.

We then examined the effect of TRB3 RNAi on the AARE-dependent response to leucine starvation using the 2xAARE.TK.Luciferase and NSRE1 + 2.TK.Luciferase constructs. These constructs were transiently transfected into HeLa cells and luciferase measured in control and leucine-starved cells. For both constructs, the basal and the induced (leucine starvation) activities were enhanced when cells were treated with TRB3 RNAi compared with control RNAi (Fig. 3C). Taken together these results show that TRB3 is induced by the ISR pathway and represses the ATF4/AARE-dependent transcription. Therefore, TRB3 is a negative feedback regulator of the GCN2/ATF4 pathway.

**TRB3 Is Associated with ATF4 in the Protein Complex Bound to the AARE**—The molecular mechanism responsible for TRB3-dependent inhibition of the GCN2/ATF4 pathway is not known. One can raise several hypotheses for the mode of TRB3 action. First, upon binding of TRB3 to ATF4, ATF4 might be degraded or destabilized. This hypothesis is coherent with the characteristics of the *Drosophila* TRB3 ortholog Tribble, which has been shown to increase the ubiquitination and degradation of the slbo protein, a C/EBP transcription factor involved in cell migration during oogenesis (32). However, in mammals, TRB3





**FIGURE 3. Inhibition of TRB3 potentiates CHOP and ASNS induction by leucine starvation.** A and B, HeLa cells were transfected with either Control siRNA (CTRL) or TRB3 siRNA (TRB3). 24 h post-transfection, cells were incubated in either DMEM or leucine-free DMEM for 4 h, then harvested (A) for analysis of TRB3, and  $\beta$ -actin protein expression (a quantification of the blot is shown as a histogram) or (B) for analysis of gene expression using qRT-PCR, as described under "Experimental Procedures." C, HeLa cells were transfected with either Control siRNA (CTRL) or TRB3 siRNA (TRB3) together with a reporter plasmid containing either 2 copies of the CHOP AARE (–313 to –295) inserted 5' to the TK promoter driving luciferase gene (2xARE.TK.Luc) or ASNS NSRE1 + NSRE2 inserted 5' to the TK promoter driving Luciferase gene (NSRE1 + 2.TK.Luc). 24 h post-transfection, cells were incubated in either DMEM (Control, black bars) or leucine-free DMEM (–Leucine, gray bars) for 16 h then harvested for preparation of cell extracts and determination of luciferase activity as described under "Experimental Procedures."

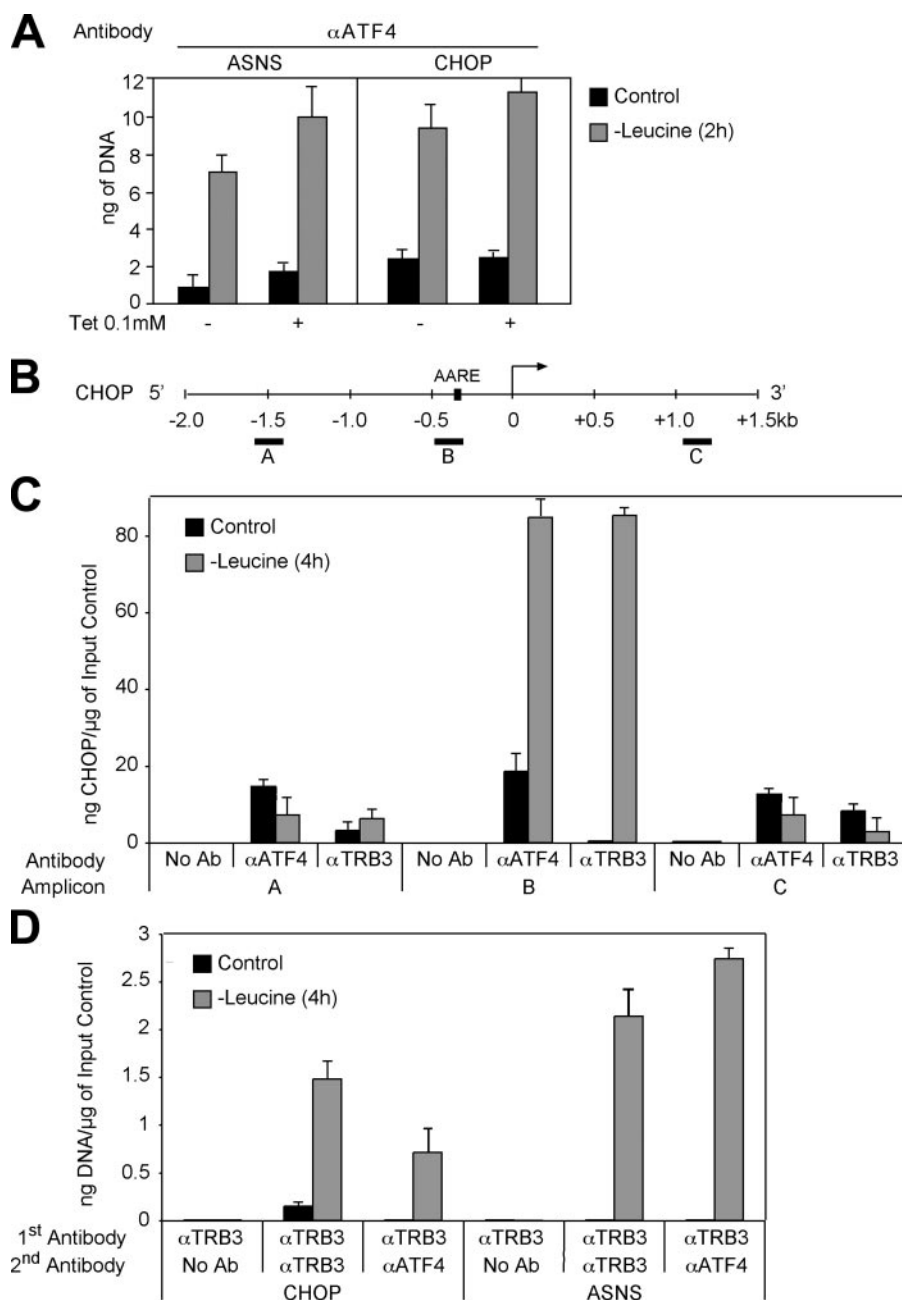
does not seem to play a role in protein degradation. Indeed, TRB3 has been shown to interact with CHOP and ATF4 but did not promote their degradation (21, 24). Our results confirm these observations since the elevation of TRB3 in leucine-depleted tet-TRB3myc cells treated with tetracycline did not alter the level of ATF4 (Fig. 2A).

Our second hypothesis was that TRB3 might affect ATF4 binding to the AARE. Indeed, leucine starvation triggers ATF4 expression, which then binds to the AARE sequence, in conjunction with other transcription factors, to regulate target genes (17). To determine whether ATF4 binding is affected by TRB3 overexpression, tet-TRB3myc cells were pretreated or not for 16 h with 0.1  $\mu$ M tetracycline and then incubated in either control or leucine-free medium for 2 h. By using anti-ATF4 ChIP experiments, we found that TRB3 does not affect ATF4 binding on both CHOP AARE and ASNS NSRE (Fig. 4A).

Because TRB3 does not prevent ATF4 binding on its DNA *cis*-element, we can hypothesize that TRB3 might bind ATF4 on DNA. To check this hypothesis, cells were incubated for 4 h in either control or leucine-free medium then cells were harvested and ChIP experiment performed using anti-ATF4 and anti-TRB3 antibodies. Firstly, ChIP assays were performed with primer sets covering either the 5' region (amplicon A), the AARE (amplicon B), or the first intron (amplicon C) of the CHOP gene (Fig. 4B). The results show a dramatic increase in both ATF4 and TRB3 binding to the AARE (amplicon B) following leucine deprivation (Fig. 4C). Furthermore, binding of ATF4 and TRB3 on the 5' region and in the first intron of CHOP was very low and not induced by leucine starvation. Taken together these results suggest that ATF4 and TRB3 bind the CHOP gene specifically on the AARE region.

Secondly, to validate that ATF4 and TRB3 belong to the same protein complex that bind the AARE, we performed sequential immunoprecipitations of chromatin with both antibodies (sequential ChIP). A first immunoprecipitation was performed with the anti-TRB3 antibody. After elution, a second immunoprecipitation was carried out with the anti-ATF4 antibody. Appropriate control experiments were performed (no antibody or anti-TRB3 as second antibody). Fig. 4D shows that both the CHOP AARE and the ASNS NSRE1 regions are immunoprecipitated from the leucine-depleted cell when anti-TRB3 and anti-ATF4 antibodies were used in the sequential ChIP experiment. These results suggest that TRB3 and ATF4 are present in the same protein complex that binds to the DNA *cis*-response element.

**TRB3 Inhibits ATF4-dependent Transcription Independently of ATF4-specific Partners**—Because TRB3 inhibits transcription by binding to the ATF4 protein complex bound on DNA, one can speculate about the molecular mechanisms involved in this process. Either it affects chromatin structure (via post-translational regulation of histones) or it interferes with the cross-talk between ATF4 and the transcription apparatus. Chen *et al.* (33) demonstrated a significant change in ASNS promoter histone acetylation during amino acid deprivation (increase in histone H3 and H4 acetylation). Therefore, using ChIP experiments, we investigated the effects of TRB3 overexpression on histone acetylation and found that H3 and H4 acetylation on ASNS promoter observed following leucine star-



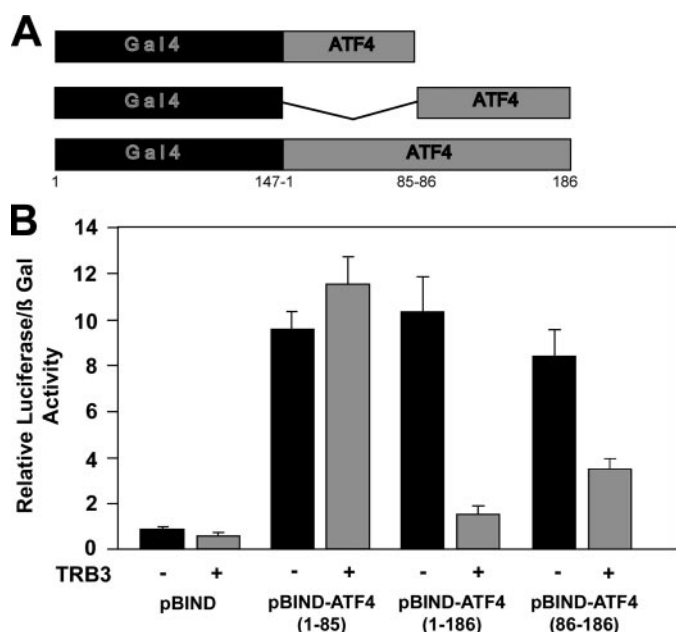
**FIGURE 4. TRB3 is associated with ATF4 in the complex bound to DNA.** *A*, Tet-TRB3myc cells were pretreated in DMEM  $\pm$  tetracycline 0.1  $\mu$ M for 16 h, then incubated in DMEM/F12 (Control, black bars) or in DMEM/F12 lacking leucine ( $-$ leucine, gray bars) for 2 h. Chromatin immunoprecipitation analysis was performed as described under "Experimental Procedures" using antibodies specific for ATF4. *B*, scheme of the mouse CHOP gene indicating the different amplicons produced for the ChIP analysis. The AARE is boxed in gray. *C* and *D*, MEFs cells were incubated in DMEM/F12 (Control, black bars) or in DMEM/F12 lacking leucine ( $-$ leucine, gray bars) for 4 h. *C*, chromatin immunoprecipitation analysis or (*D*) sequential chromatin immunoprecipitation analysis were performed as described under "Experimental Procedures."

vation were not affected by TRB3 overexpression (data not shown). Similar data were observed with CHOP promoter (not shown). Chromatin structure (*i.e.* modification of histone acetylation) does not seem to be involved in the TRB3-dependent inhibition of ASNS transcription upon amino acid starvation. This finding is coherent with the fact that this inhibition is also observed on exogenous plasmid constructs.

We can then hypothesized that TRB3 could interfere with the cross-talk between ATF4 and some of its partners (either

specific or general). Indeed, ATF4 has been shown to interact with general partners such as proteins belonging to the transcription initiation complex such as CBP, TFIIB, TBP (34). In addition, ATF4 is a b-zip transcription factor binding to DNA as a dimer with a specific transcription factor, which can be different according to the context. To test whether specific partners of ATF4 are involved during amino acid starvation, we measured the effect of TRB3 on ATF4-dependent transcription in an artificial context lacking any specific factor. For that purpose, we used a one-hybrid system in which only ATF4 and general factors are present and in which any factor specifically interacting with ATF4 in the context of amino acid starvation are absent. A construct (pBIND.Gal4-ATF4-(1-186)) expressing a fusion protein constituted of the yeast GAL4 DNA-binding domain and the transcriptional activation domain of ATF4 (amino acids 1-186) was co-expressed with a plasmid expressing the luciferase reporter gene under the control of five GAL4 binding sites (pG5-luc). Then we studied the expression of luciferase by ATF4-Gal4 in presence or not of TRB3. Because it was previously shown that TRB3 interacts with ATF4 between the amino acids 50 and 125, we have generated two control constructions (Fig. 5*A*). The first one, (pBIND.Gal4-ATF4-(1-85)) expresses the GAL4 DNA binding domain fused to a short domain of ATF4 that maintains a functional transcriptional activation domain but does not interact with TRB3. The second one, (pBIND.Gal4-ATF4-(86-186)) contains the domain of ATF4 that interacts with TRB3 and was deleted of the N-terminal region. According to

Liang and Hai (34) ATF4 contains several transcriptional activation domains; therefore, this fusion protein should still be able to activate transcription. As expected, Fig. 5 shows that any domain of ATF4 fused to GAL4 resulted in transcriptional activation of the firefly luciferase reporter gene as compared with GAL4 alone (pBIND). Moreover, we found that the concomitant overexpression of TRB3 strongly decreases the transactivation by the GAL4-ATF4-(1-186) and GAL-ATF4-(86-186) constructs whereas it has no effect on the GAL4-ATF4-(1-85)



**FIGURE 5. Effect of TRB3 on the transactivating activity of ATF4.** A, schematic representation of Gal4-ATF4 fusion constructs used in B. B, HeLa cells were transfected with a reporter plasmid (pGL5.Luc) containing 5 GAL4 binding sites upstream of the luciferase gene together with pBIND vectors (either pBIND, expressing Gal4; pBIND-ATF4-(1–85), expressing an in-frame fusion of Gal4 with the 85 first amino acids of ATF4; pBIND-ATF4-(1–186), expressing an in-frame fusion of Gal4 with the 186 first amino acids of ATF4 or pBIND-ATF4-(86–186), expressing an in-frame fusion of Gal4 with the amino acids 86 to 186 of ATF4) and an expression vector, pcDNA4 TO Myc His (either empty, black bars, or expressing full-length TRB3, gray bars). Cells were harvested 40 h post-transfection for preparation of cell extracts and determination of luciferase activity as described under “Experimental Procedures.”

construct that cannot bind TRB3 (Fig. 5). These results demonstrate that binding of TRB3 to ATF4 inhibits ATF4 transactivating activity independently of any specific partner. We can then conclude that specific transcription factor partner of ATF4 as well as the chromatin context is not involved in the TRB3 effect. Therefore, it is likely that TRB3 affects the ATF4-dependent transcription by interfering with the association of coactivator(s) or by recruiting corepressor(s) to DNA.

*Transcriptional Profiling Shows That TRB3 Affects the Expression of Many Genes Regulated upon the Activation of the GCN2/ATF4 Pathway*—It has been previously shown that the ATF4-mediated ISR controls the expression of many genes involved in amino acid metabolism and resistance to oxidative stress in various cell types (1). Using gene expression microarray, we investigated the importance of TRB3 regulatory effects on ATF4-dependent genes. In our study, we used a Student's *t* test with Bonferroni adjustment (with a *p* value of <0.01 and a ratio cut-off of >2) to identify genes differentially expressed by leucine starvation, and we measured both their dependence toward ATF4 and the effect of TRB3 overexpression on their amino acid-dependent regulation.

First of all, we controlled that tetracycline, by itself, does not regulate gene expression by comparing the profile of genes expressed in parental cells untreated and treated with 0.1  $\mu$ M tetracycline for 16 h. No genes were found to be down-regulated by tetracycline and few genes were slightly induced. If anything, this could only decrease the importance of the inhib-

itory effects of TRB3 (not shown). We also checked whether TRB3 overexpression by itself affects the expression of genes by comparing the profile of genes expressed in tet-TRB3myc cells untreated and treated with 0.1  $\mu$ M tetracycline for 16 h. We found that TRB3 overexpression induces slightly few genes (induction ratio below 2). However, among the genes up-regulated by leucine starvation, none of them was found to be regulated by TRB3 overexpression alone (results not shown).

To determine the dependence toward ATF4 and the effect of TRB3 overexpression, we compared data from ATF4<sup>+/+</sup> and ATF4<sup>-/-</sup> cells to data from tet-TRB3myc cells treated or not by tetracycline. Because it was necessary to use two different cell lines (dependence toward TRB3 is determined by using human HeLa cells and dependence toward ATF4 by using MEFs), we restrained the comparison to genes induced by leucine starvation in both models. We found 40 genes induced more than 2-fold by a 4-hour leucine starvation in both cell line (Table 1). Among these 40 genes, 34 are ATF4-dependent genes (Table 1, highlighted in yellow) and 6 genes are totally or partially ATF4-independent (Table 1 highlighted in dark or clear green, respectively). In regard to TRB3 effects, we considered that a gene is not affected by TRB3 overexpression when more than 75% of its induction upon leucine starvation is maintained in cells overexpressing TRB3. Twenty-six genes are not affected by TRB3 overexpression (Table 1 highlighted in purple) whereas the induction ratio of 14 genes is decreased (Table 1 highlighted in sharp yellow).

If we now focus on the ATF4-dependent genes, we found that 41% of the ATF4-dependent genes are affected by TRB3 and 100% of the genes affected by TRB3 are indeed ATF4-dependent genes. On the other hand, all the ATF4-independent genes are unaffected by TRB3. It is noticeable, that the effects of TRB3 would appear underestimated because the induction of certain genes by leucine starvation may be only partially ATF4-dependent rendering the consequence of TRB3 expression difficult to measure. We can conclude that TRB3 plays a broad role in down-regulating a large panel of the ATF4-dependent genes.

## DISCUSSION

In this article, we show that TRB3 inhibits via a feed-back mechanism, the ISR. Indeed, TRB3 is induced by ISR (ER stress or amino acid starvation) via an ATF4-dependent pathway, then TRB3 overexpression strongly inhibits the ATF4-dependent transcription. At the molecular level, our results suggest that TRB3 belongs to the ATF4 complex bound on its DNA target and inhibits transcription. In the context of genes regulated by amino acid starvation, transcriptional profiling experiment shows that TRB3 represses numerous ATF4-induced genes.

Our results also demonstrate that TRB3 is involved in the control of the basal level of gene expression under control/unstressed conditions. Indeed, in non-stimulated cells, whereas endogenous TRB3 is expressed at a very low level, its invalidation by siRNA increases about 4-fold the basal level of ASNS (Fig. 4). A more modest increase in the basal level of CHOP expression was also found (data not shown). Therefore, based



TABLE 1

List of genes induced at least 2-fold by amino acid starvation in both tet-TRB3myc and ATF4 +/+ cells

-Fold induction is the mean of the ratio of the hybridization signals in -leucine versus control cells (-leu/ctrl). The dependency of each gene either toward ATF4 or toward TRB3 is color-coded as indicated under the table.

NAME	ID	ID	GENE NAME	PROCESS	FOLD INDUCTION			
					ATF4 +/+ -leu/ctrl	ATF4 -/- -leu/ctrl	-TRB3 -leu/ctrl	+TRB3 -leu/ctrl
TRIB3	57761	228775	tribbles homolog 3 (Drosophila)	regulation of transcription, DNA dependent	7.3	1.22	5.79	2.6
<b>amino acid metabolism and transport</b>								
CTH	1491	107869	cystathionase (cystathionine gamma-lyase)	cysteine biosynthesis	6.23	0.66	3.17	1.75
PSPH	5723	100678	phosphoserine phosphatase	L-serine metabolism	3.82	0.61	3.11	1.88
ASNS	440	27053	asparagine synthetase	aspartate family amino acid biosynthesis	3.12	1.1	7.88	3.5
SARS	6301	20226	seryl-tRNA synthetase	tRNA aminoacylation	2.74	1.28	2.25	1.98
GARS	2617	353172	glycyl-tRNA synthetase	tRNA aminoacylation	2.5	0.97	3.00	2.11
NARS	4677	70223	asparaginyl-tRNA synthetase	tRNA aminoacylation	2.5	0.99	2.05	2.03
PSAT1	29968	107272	phosphoserine aminotransferase 1	L-serine metabolism	2.49	1.03	4.14	2.97
WARS	7453	22375	tryptophanyl-tRNA synthetase	tRNA aminoacylation	2.47	1.52	2.01	1.71
SLC3A2	6520	17254	solute carrier family 3 (activators of dibasic and neutral amino acid transport), member 2	amino acid transport	2.42	1.08	2.06	1.78
AARS	16	234734	alanyl-tRNA synthetase	tRNA aminoacylation	2.18	0.89	2.68	2.54
PYCR1	5831	209027	pyrroline-5-carboxylate reductase 1	amino acid biosynthesis	2.16	1.02	2.00	1.78
SHMT2	6472	108037	serine hydroxymethyltransferase 2 (mitochondrial)	L-serine and glycine metabolism	2.07	0.86	2.11	1.94
<b>regulation of transcription</b>								
DDIT3 (-CHOP)	1649	13198	DNA-damage-inducible transcript 3	regulation of transcription, DNA dependent	6.03	1.58	3.47	1.95
ATF3	467	11910	activating transcription factor 3	regulation of transcription, DNA dependent	5.82	3.21	5.8	5.65
CEBPB	1054	12611	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), gamma	regulation of transcription, DNA dependent	2.62	1.44	3.91	3.32
SNAI2	6591	20583	snail homolog 2 (Drosophila)	regulation of transcription, DNA dependent	2.55	1.8	2.41	2.61
KLF5	688	12224	Kruppel-like factor 5 (intestinal)	regulation of transcription, DNA dependent	2.34	3.31	3.2	3.48
THRAP2	23389	76199	thyroid hormone receptor associated protein 2	regulation of transcription, DNA dependent	2.23	1.6	2.39	2.73
KLF9	687	16601	Kruppel-like factor 9	regulation of transcription, DNA dependent	2.22	1.59	2.02	2.09
CEBPB	1051	12608	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	regulation of transcription, DNA dependent	2.00	1.33	4.19	3.36
<b>apoptosis</b>								
GADD45A	1647	13197	growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	cell cycle, negative regulation of protein kinase activity	6.58	2.2	3.68	3.27
DDIT4	54541	74747	DNA-damage-inducible transcript 4	apoptosis	4.25	0.92	2.9	2.07
PMAP1	5366	58801	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	induction of apoptosis	2.33	1.32	5.52	3.37
TNFRSF12A	51330	27279	tumor necrosis factor receptor superfamily member 12A	cell death	2.04	0.93	2.48	2.85
<b>translation</b>								
EIF2S2	8894	67204	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 2 beta, 38kDa	translational initiation, protein biosynthesis	2.85	1.32	2.69	2.38
EIF4EBP1	1978	13685	eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1	regulation of translation	2.46	1.13	2.07	1.98
<b>other</b>								
GDF15	9518	23886	growth differentiation factor 15	receptor signaling pathway	4.93	1.13	5.71	2.21
STC2	8614	20856	stanniocalcin 2	response to nutrient	4.53	1.14	4.05	2.3
MTFHD2	10797	17768	methylene-tetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 2, methenyltetrahydrofolate	folic acid and derivative biosynthesis	3.00	0.98	3.6	2.5
AREG	374	11839	amphiregulin (schwannoma-derived growth factor)	cell-cell signaling	2.85	1.21	4.04	4.52
CTGF	1490	14219	connective tissue growth factor	regulation of cell growth	2.78	4.1	2.25	2.5
XPOT	11260	73192	exportin, tRNA (nuclear export receptor for tRNAs)	transport	2.38	1.28	2.18	2.1
PTGS2	5743	19225	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	fatty acid biosynthesis	2.32	3.62	2.86	3.25
VINT11	7481	22411	wingless-type MMTV integration site family, member 11	cell-cell signaling	2.3	1.11	2.05	1.88
PKC2	5108	74551	phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (mitochondrial)	glucose metabolism	2.27	0.89	3.68	2.12
MID1IP1	58526	68041	MID1 interacting protein 1 (gastrulation specific G12-like (zebrafish))	regulation of microtubule organization	2.24	1.01	2.39	2.69
IL6	3569	16193	interleukin 6 (interferon, beta 2)	cell-cell signaling	2.11	1.85	3.65	3.58
JAG1	182	16449	jagged 1 (Alagille syndrome)	development	2.1	1.59	3.39	3.43
HERPUD1	9708	64208	homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1	response to unfolded protein	2.07	0.27	3.24	1.7
<b>color codes:</b>								
<div> <div></div> ATF4-dependent genes                 </div> <div> <div></div> partially ATF4-independent genes                 </div> <div> <div></div> totally ATF4-independent genes                 </div> <div> <div></div> TRB3-dependent genes                 </div> <div> <div></div> TRB3-independent genes                 </div>								

on the example of these two ATF4-regulated genes, our results demonstrate that TRB3 finely controls the expression level of genes regulated by ATF4 under both stressed and unstressed conditions. Because ATF4 is implicated in many biological processes such as memory formation (35), mammalian development (36, 37) amino acid metabolism, and resistance to oxidative stress (1) we can expect that TRB3 also participates to the fine regulation of these physiological processes.

Although TRB3 is conserved in many species, the molecular mechanisms involved in the TRB3-dependent regulation of gene expression appear to be different between insects and mammals. In *Drosophila*, tribbles has been shown to increase specific protein degradation (32). However, in mammals, TRB3 does not seem to play a role in protein degradation. Indeed, published data (21, 24) and our results indicate that ATF4 degradation does not account for the inhibitory effect of TRB3 on ATF4 transactivation. Rather, our data suggest that TRB3 inhibits ATF4 by binding its N-terminal region directly on the DNA *cis*-element. It is thus likely that TRB3 inhibits ATF4 transactivation by interfering with the association/recruitment of coactivator(s)/corepressor(s) to DNA such as CBP, TBP, TFIIB, and RAP30 (34).

Data from literature described TRB3 as a "scaffold-like regulatory protein" for a number of signaling pathways (38). This

characteristic is confirmed by the transcriptional profiling experiment, which demonstrate that overexpression of TRB3 alone does not significantly regulate gene expression. One of the known functions of TRB3 concerns the control of apoptosis. Particularly, Ohoka *et al.* (24) have recently shown that TRB3 is involved in the control of cell death during ER stress. ATF4 and CHOP have been shown to be inducers of apoptosis and p65 generally promotes survival. Because TRB3 have been shown to regulate these factors, it is tempting to speculate that TRB3 may be a decision point between these two cellular responses under stress conditions. Our results, showing that TRB3 inhibits the ISR via a feedback mechanism reinforce the hypothesis that TRB3 could be a sensor for ER stress-induced apoptosis. Particularly, in case of a mild activation of the ISR, the induced TRB3 blocks the expression of ATF4-dependent genes. However, the role of TRB3 appears much more complex because Ohoka *et al.* (24) showed that ectopic TRB3 overexpression increased cell death in response to high concentration of tunicamycin. One can conclude that, in case of intense ER stress, TRB3 could cause apoptosis by a function/mechanism different from the inhibition of ATF4-dependent transcription. Because (i) ER stress regulates at least 3 identified signaling pathways and (ii) apoptosis is regulated by the interaction of several pathways, the precise knowledge of the role of TRB3 in the control of apoptosis remains to be clarified.

At a physiological level, the Montminy group showed new roles for TRB3. They established that TRB3 inhibits Akt activation by insulin in liver (25) and inhibits ACC in adipose tissue (26), suggesting a role of TRB3 in lipid and glucides metabolism. Two observations reinforced their data: (i) TRB3 expression was shown to be strongly affected in the case of obesity or insulin resistance and (ii) a polymorphism in the *TRB3* gene is associated with insulin resistance and cardiovascular risk in humans (39). The mechanisms involved in the regulation of TRB3 expression in liver and adipose tissue have not been studied yet. Because TRB3 is involved in the regulation of many different biological functions in several tissues, it is coherent that many processes regulate its expression. We do not know whether ATF4 (or the ISR) plays a role in the control of TRB3 expression in metabolic tissues.

Recent data provide arguments suggesting that TRB3 is involved in the control of amino acid and protein metabolism: 1) Matsushima *et al.* (40) have shown that TRB3 is a potent regulator of p70S6 kinase (S6K1) activation by insulin; 2) our results showing that TRB3 inhibits ATF4 in response to amino acid starvation bring indirect evidence that TRB3 could be involved in the control of amino acid metabolism. Indeed, considering that ATF4 is implicated in the control of amino acid metabolism and transport (1), we could hypothesize that TRB3 could also be indirectly involved in this process. In addition, we have shown that the GCN2 pathway controls the amino acid homeostasis in omnivores (41). Because ATF4 is the only known pathway downstream of GCN2 it is tempting to speculate that ATF4 and thus TRB3 could also participate to the control of amino acid homeostasis. From all these observations we can hypothesize that TRB3 may be a key regulator of metabolism. However, the precise role of TRB3 in the control of the amino acid metabolism, at a physiological level, remains to be investigated.

It is now clear that following the activation of the integrated stress response pathway, a highly coordinated time-dependent program of molecular events takes place, leading to a fine regulation of transcriptional activation. Our results show that TRB3 regulates the ISR by a negative feedback mechanism. Moreover, the endogenous TRB3 is involved under stressed and normal condition in the fine control of ATF4-regulated genes. Several recent publications demonstrate that TRB3 is an important factor in (i) the response to nutrient starvation, (ii) the glucose metabolism, and (iii) the regulation of cellular functions such as apoptosis. Understanding the role of TRB3 and the regulation of its expression level would improve our comprehension on the control of several signaling pathways. TRB3 may be a potential therapeutic target for metabolic diseases or diseases that involve stress-dependent cell death (neurodegenerative diseases, diabetes).

**Acknowledgments**—We thank Stéphanie Chauvet for the statistical analysis of microarray data and Jean-Paul Pégrier and Claire Suterlin for kindly providing us with plasmids.

## REFERENCES

- Harding, H. P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P. D., Calton, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B., Paules, R., Stojdl, D. F., Bell, J. C., Hettmann, T.,

- Leiden, J. M., and Ron, D. (2003) *Mol. Cell* **11**, 619–633
- Harding, H. P., Calton, M., Urano, F., Novoa, I., and Ron, D. (2002) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **18**, 575–599
- Dever, T. E. (2002) *Cell* **108**, 545–556
- Rutkowski, D. T., and Kaufman, R. J. (2003) *Dev. Cell* **4**, 442–444
- Kaufman, R. J. (2000) in *Translational Control of Gene Expression* (Sonenberg, N., and Mathews, M. B., ed), pp. 503–527, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Harding, H. P., Novoa, I. I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M., and Ron, D. (2000) *Mol. Cell* **6**, 1099–1108
- Zhang, P., McGrath, B. C., Reinert, J., Olsen, D. S., Lei, L., Gill, S., Wek, S. A., Vattam, K. M., Wek, R. C., Kimball, S. R., Jefferson, L. S., and Cavener, D. R. (2002) *Mol. Cell. Biol.* **22**, 6681–6688
- Han, A. P., Yu, C., Lu, L., Fujiwara, Y., Browne, C., Chin, G., Fleming, M., Leboulch, P., Orkin, S. H., and Chen, J. J. (2001) *EMBO J.* **20**, 6909–6918
- Ron, D. (2002) *J. Clin. Invest.* **110**, 1383–1388
- Sok, J., Wang, X. Z., Batchvarova, N., Kuroda, M., Harding, H., and Ron, D. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**, 495–504
- Wang, X. Z., Kuroda, M., Sok, J., Batchvarova, N., Kimmel, R., Chung, P., Zinszner, H., and Ron, D. (1998) *EMBO J.* **17**, 3619–3630
- Zinszner, H., Kuroda, M., Wang, X., Batchvarova, N., Lightfoot, R. T., Remotti, H., Stevens, J. L., and Ron, D. (1998) *Genes Dev.* **12**, 982–995
- Novoa, I., Zeng, H., Harding, H. P., and Ron, D. (2001) *J. Cell Biol.* **153**, 1011–1022
- Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Jungreis, R., Harding, H. P., and Ron, D. (2003) *EMBO J.* **22**, 1180–1187
- Bruhat, A., Jousse, C., Wang, X. Z., Ron, D., Ferrara, M., and Fafournoux, P. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 17588–17593
- Siu, F., Chen, C., Zhong, C., and Kilberg, M. S. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 48100–48107
- Averous, J., Bruhat, A., Jousse, C., Carraro, V., Thiel, G., and Fafournoux, P. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 5288–5297
- Siu, F., Bain, P. J., LeBlanc-Chaffin, R., Chen, H., and Kilberg, M. S. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 24120–24127
- Zhong, C., Chen, C., and Kilberg, M. S. (2003) *Biochem. J.* **372**, 603–609
- Wu, M., Xu, L. G., Zhai, Z., and Shu, H. B. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 27072–27079
- Ord, D., and Ord, T. (2003) *Exp. Cell Res.* **286**, 308–320
- Ord, D., and Ord, T. (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **330**, 210–218
- Corcoran, C. A., Luo, X., He, Q., Jiang, C., Huang, Y., and Sheikh, M. S. (2005) *Cancer Biol. Ther.* **4**, 1063–1067
- Ohoka, N., Yoshii, S., Hattori, T., Onozaki, K., and Hayashi, H. (2005) *EMBO J.* **24**, 1243–1255
- Du, K., Herzig, S., Kulkarni, R. N., and Montminy, M. (2003) *Science* **300**, 1574–1577
- Qi, L., Heredia, J. E., Altarejos, J. Y., Screaton, R., Goebel, N., Niessen, S., Macleod, I. X., Liew, C. W., Kulkarni, R. N., Bain, J., Newgard, C., Nelson, M., Evans, R. M., Yates, J., and Montminy, M. (2006) *Science* **312**, 1763–1766
- Koo, S. H., Satoh, H., Herzig, S., Lee, C. H., Hedrick, S., Kulkarni, R., Evans, R. M., Olefsky, J., and Montminy, M. (2004) *Nat. Med.* **10**, 530–534
- Hall, C. V., Jacob, P. E., Ringold, G. M., and Lee, F. (1983) *J. Mol. Appl. Genet.* **2**, 101–109
- Bruhat, A., Averous, J., Carraro, V., Zhong, C., Reimold, A. M., Kilberg, M. S., and Fafournoux, P. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 48107–48114
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987) *Anal. Biochem.* **162**, 156–159
- Bruhat, A., Cherasse, Y., Maurin, A. C., Breitwieser, W., Parry, L., Deval, C., Jones, N., Jousse, C., and Fafournoux, P. (2007) *Nucleic Acids Res.*
- Rorth, P., Szabo, K., and Texido, G. (2000) *Mol. Cell* **6**, 23–30
- Chen, H., Pan, Y. X., Dudenhausen, E. E., and Kilberg, M. S. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 50829–50839
- Liang, G., and Hai, T. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 24088–24095
- Abel, T., Martin, K. C., Bartsch, D., and Kandel, E. R. (1998) *Science* **279**, 338–341

36. Masuoka, H. C., and Townes, T. M. (2002) *Blood* **99**, 736–745
37. Hettmann, T., Barton, K., and Leiden, J. M. (2000) *Dev. Biol.* **222**, 110–123
38. Hegedus, Z., Czibula, A., and Kiss-Toth, E. (2007) *Cell Signal.* **19**, 238–250
39. Prudente, S., Hribal, M. L., Flex, E., Turchi, F., Morini, E., De Cosmo, S., Bacci, S., Tassi, V., Cardellini, M., Lauro, R., Sesti, G., Dallapiccola, B., and Trischitta, V. (2005) *Diabetes* **54**, 2807–2811
40. Matsushima, R., Harada, N., Webster, N. J., Tsutsumi, Y. M., and Nakaya, Y. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 29719–29729
41. Maurin, A. C., Jousse, C., Averous, J., Parry, L., Bruhat, A., Cherasse, Y., Zeng, H., Zhang, Y., Harding, H. P., Ron, D., and Fafournoux, P. (2005) *Cell Metab.* **1**, 273–277

# **Synthèses scientifiques**

**Adaptation to amino acids limitation in mammals:**

**Mechanisms involved in the regulation of gene expression.**

**Chaveroux C., Lambert-Langlais S., Cherasse Y., Averous J., Jousse C., Maurin AC.,  
Laurent Parry L., Valérie Carraro V., Bruhat A. and Fafournoux P.**

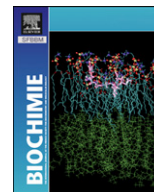
Soumise à Biochimie.





Contents lists available at ScienceDirect

Biochimie

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/biochi](http://www.elsevier.com/locate/biochi)

## Review

## Molecular mechanisms involved in the adaptation to amino acid limitation in mammals

Cédric Chaveroux, Sarah Lambert-Langlais, Yoan Cherasse, Julien Averous, Laurent Parry, Valérie Carraro, Céline Jousse, Anne-Catherine Maurin, Alain Bruhat, Pierre Fafournoux\*

Unité de Nutrition Humaine, UMR 1019, INRA de Theix, 63122 Saint Genès Champanelle, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 31 December 2009

Accepted 16 February 2010

Available online xxx

## Keywords:

Amino acid

Gene expression

GCN2

ATF4

ATF2

## ABSTRACT

In mammals, metabolic adaptations are required to cope with episodes of protein deprivation and malnutrition. Consequently, mammals have to adjust physiological functions involved in the adaptation to amino acid availability. Part of this regulation involves the modulation of the expression of numerous genes. In particular, it has been shown that amino acids by themselves can modify the expression of target genes. This review describes the regulation of amino acids homeostasis and the their role as signal molecules. The recent advances in the understanding of the molecular mechanisms involved in the control of mammalian gene expression in response to amino acid limitation will be described.

© 2010 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

## 1. Introduction

Mammals have the ability to adapt their own metabolic demand to survive in a variable and sometimes hostile environment. External stimuli to which they must be able to respond include thermal variations, rhythmic changes imposed by alternation of day and night and the need to adapt to intermittent intake of food (including periods of malnutrition). Adaptation to these external factors requires metabolic responses resulting from various regulatory mechanisms.

The regulation of metabolism is achieved by coordinated actions between tissues and by mechanisms operating at cellular level. These mechanisms involve the conditional regulation of specific genes that involve complex interactions of hormonal, neuronal and nutritional factors. Although not as widely recognized, nutritional signals play an important role in controlling gene expression in mammals. It has been shown that major (carbohydrates, fatty acids, sterols) and minor (minerals, vitamins) dietary constituents participate in the regulation of gene expression [1–5]. In the last decade, significant progress has been achieved in the understanding of molecular mechanisms involved in the control of mammalian gene expression in response to amino acid availability [6–8]. On the basis of the characteristics of amino acid metabolism and homeostasis, the present article reviews the mechanisms involved in the adaptation to amino acid limitation in mammals.

## 2. Regulation of amino acid metabolism and homeostasis

Amino acids exhibit two important characteristics. Firstly, in healthy adult humans, 9 amino acids (valine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, phenylalanine, threonine, histidine and tryptophan) cannot be synthesized *de novo* and are designated as indispensable (or essential) amino acids and have to be supplied by the food. In addition, under a particular set of conditions certain dispensable (non-essential) amino acids may become indispensable. These amino acids are called “conditionally indispensable”. For example, enough arginine is synthesized by the liver (urea cycle) and by the kidney (from citrulline) to meet the needs of an adult but not those of a growing child. Secondly, there are no specific stores of amino acids. Consequently, if and when necessary, an organism has to hydrolyze muscle protein to produce free amino acids. This loss of protein will be at the expense of essential elements. Therefore complex and specific mechanisms are needed that take these amino acid characteristics into account in order to maintain the free amino acid pools.

## 2.1. Free amino acid pool

The size of the cellular pool of each amino acid is the result of a balance between input and removal (Fig. 1). The metabolic outlets for amino acids are protein synthesis and amino acid degradation whereas the inputs are *de novo* synthesis (for non-essential amino acids), protein breakdown and dietary supply. Changes in the rates of these systems lead to an adjustment in nitrogen balance. For example,

\* Corresponding author. Tel.: +33 4 73 62 45 62; fax: +33 4 73 62 47 55.  
E-mail address: [pierre.fafournoux@clermont.inra.fr](mailto:pierre.fafournoux@clermont.inra.fr) (P. Fafournoux).



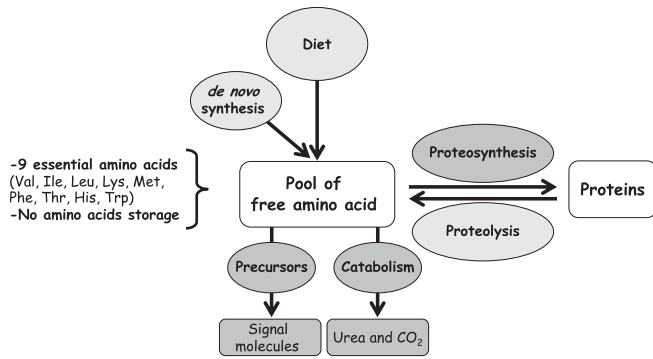


Fig. 1. Biochemical systems involved in the homeostasis of proteins and amino acids.

the plasma concentration of amino acids has been reported to rise following the administration of a protein-containing meal to animals or humans. The concentration of leucine and some other amino acids approximately doubles in peripheral blood following a protein-rich meal [9] and reaches much higher concentrations within the portal vein [10]. Most of the essential amino acids are degraded in the liver, except the branched chain amino acids and methionine that are poorly taken up by hepatocytes. Consequently, after a protein-rich meal, these amino acids pass through the liver into the general circulation and cause a much greater increment in systemic blood levels than other essential amino acids [11,12]. Several data demonstrate that the effect of a protein-rich meal on protein turn-over is due to postprandial increases in the concentrations of circulating amino acids [13,14].

On the other hand, an adjustment of the nitrogen balance is also necessary in case of protein malnutrition. Indeed, a dramatic drop in the plasma concentrations of certain essential amino acids has been shown to occur following insufficient amino acid or protein intake. A few examples of adaptation to a lack of dietary amino acid are described below in more detail.

## 2.2. Specific examples of adaptation to amino acid deficiency

### 2.2.1. Protein undernutrition

Protein undernutrition has its most devastating consequences during growth. Prolonged feeding on a low protein diet causes a fall in the plasma level of most essential amino acids [15,16]. It follows that individuals have to adjust several physiological functions in order to adapt to amino acid deficiency. One of the main consequences of feeding a low protein diet is the dramatic inhibition of growth in young individuals. Growth is controlled by a complex interaction of genetic, hormonal and nutritional factors. A large part of this control is due to growth hormone (GH) and insulin-like growth factors (IGFs). The biological activities of IGFs are modulated by the IGF-binding proteins (IGFBPs) that specifically bind IGF-I and IGF-II [17,18]. Straus et al. [19] demonstrated that a dramatic overexpression of IGFBP-1 was responsible for growth inhibition in response to prolonged feeding on a low protein diet. *In vivo*, the known regulators of IGFBP-1 expression are mainly GH, insulin and glucose. However, the high IGFBP-1 levels found in response to a protein-deficient diet cannot be explained by these factors. It has been demonstrated that a fall in blood amino acid concentration was directly responsible for IGFBP-1 induction [19–21]. Therefore, amino acid limitation, such as during dietary protein deficiency, contributes to the down-regulation of growth through the induction of IGFBP-1.

### 2.2.2. Imbalanced diet

Amino acid-imbalanced diets can be a frequent nutritional situation for wild omnivorous animals. For example, rodents are often

confronted with poor food availability with a single plant protein source, which is most likely partially deficient for one essential amino acid. Indeed, most cereals are partially devoid of lysine while leguminous plants may be partially devoid of methionine. After eating an amino acid-imbalanced diet, animals first recognize the amino acid deficiency and then respond by reducing their food intake (Fig. 2). This innate aversive response biases the diet against imbalanced food sources. Recognition and anorexia resulting from an amino acid-imbalanced diet take place very rapidly [22–25]. The mechanisms that underlie the recognition of protein quality must act via the free amino acids resulting from intestinal digestion of proteins. The decrease in blood concentration of the limiting amino acid becomes apparent as early as a few minutes after feeding an imbalanced diet and depends on the extent of deficiency [25]. The anorectic response is correlated with a decreased concentration of the limiting amino acid in the plasma. Several lines of evidence have suggested that the fall in the limiting amino acid concentration is detected in the brain. It has been proposed that a specific brain area, the anterior piriform cortex (APC), can sense the variations in amino acid concentrations [24,22,26]. This recognition phase is associated with a localized decrease in the concentration of the limiting amino acid and changes in protein synthesis rate and gene expression [22].

### 2.2.3. Pathological situation

In addition to nutritional factors, various forms of stress (trauma, thermal burn, sepsis, fever etc) can affect nitrogen metabolism, amino acidemia and lead to a state of negative nitrogen balance and significant loss of body mass [27–32]. The hypercatabolic state observed during these stress situations is characterized by an increase in protein synthesis and degradation. However, protein synthesis remains insufficient to compensate for higher proteolysis. The amino acids freed by muscular proteolysis are mostly used by the liver to synthesize proteins involved in the inflammatory response. Consequently high variations of amino acid concentrations in plasma and urine can be observed. In such situations, changes in nitrogen metabolism can be ascribed to several hormonal, metabolic, and behavioral changes.

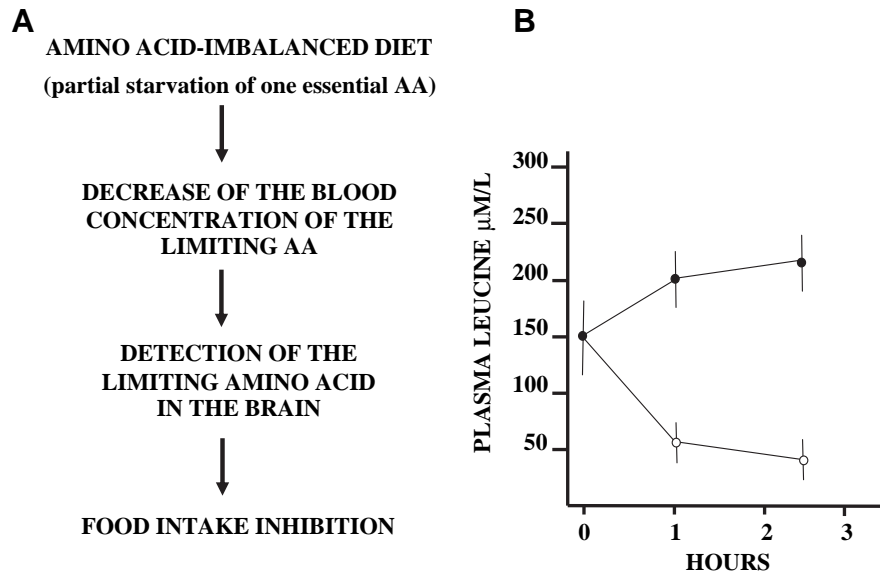
Taken together, these examples show that amino acidemia can be affected by various nutritional or pathological situations with one major consequence being a large variation of blood amino acid concentration. It follows that mammals have to adjust several of their physiological functions involved in the defense/adaptation to amino acid limitation by controlling physiological functions through regulation of the expression of numerous genes. Several steps forward have been made recently in our understanding of the mechanisms by which amino acid limitation controls the expression of specific genes. The present review focuses on the regulatory role of low amino acid availability. The effects of an excess of amino acids are not considered herein.

## 3. Target genes affected by amino acid limitation

Previous studies in the 1990's identified several genes regulated by amino acid availability [18,33]. More recently, array analyses of amino acid deprived cells identified two sets of amino acid-regulated genes: genes that are down or up-regulated [34–36]. Briefly, the functions of genes regulated by amino acid limitation illustrate the organism's need to adapt to a changing nutritional environment.

Genes that are specifically down-regulated by amino acid starvation encode proteins that are mainly involved in lipid and carbohydrate metabolic processes, regulation of transcription, signal transduction [35] etc. The molecular mechanisms involved in such down-regulation have not yet been identified.

Among the up-regulated genes in response to amino acid starvation, a large number encodes plasma membrane amino acid transporters. Other identified genes include genes encoding for



**Fig. 2.** Response of mice to an amino acid-imbalanced diet. A) Sequence of events involved in the response to an amino acid-imbalanced diet. B) Blood leucine concentration in mice fed a leucine imbalanced diet. Mice were housed in a light:dark cycle, with food deprivation during the light phase. Fig. 2B shows the leucine concentrations in plasma of mice killed at the end of the starved period and at 1 and 2.5 h after the beginning of the meal. White dots: Leucine imbalanced diet containing 6g of leucine/Kg of food. Black dots: Leucine-corrected diet (control diet) 19 g of leucine/Kg of food.

transcription factors (ATF3, C/EBP $\alpha$ , c-jun etc), genes encoding ribosomal proteins or involved in the signal transduction processes, etc. The most extensively studied genes are: asparagine synthetase (ASNS); C/EBP Homologous Protein (CHOP); neutral amino acid transporter System A, mediated by the SNAT2 gene product; cationic amino acid transporter, mediated by the CAT-1 gene product [7,18,33,37]. More details will be given later in this article to illustrate the molecular mechanisms by which gene expression is up-regulated upon amino acid starvation.

#### 4. Molecular mechanisms involved in the regulation of gene expression by amino acid limitation in mammals

Three distinct mechanisms involved in the up-regulation of gene expression by amino acid deficiency have been identified so far: (i) mRNA stabilization; (ii) up-regulation of the translation rate of one specific transcript; (iii) transcriptional control.

##### 4.1. Stabilization of mRNA following amino acid starvation

Control of mRNA stability represents a critical regulatory mechanism of gene expression that is not as well understood as transcriptional regulation. Sequences called ARE (AU-rich elements), mostly located in the 3'-untranslated region of the transcript, control mRNA degradation or stabilization. Among the ARE-binding proteins, the ubiquitously expressed HuR protein has been associated with (i) post-transcriptional stabilization (ii) nuclear export and (iii) control of translation of mRNA [38].

Yaman et al. [39] demonstrated that protein HuR had the ability to bind the ARE of the arginine/lysine transporter (CAT-1) transcript. They also reported that amino acid limitation caused increased HuR accumulation in the cytoplasm. Consistent with that observation, cytoplasmic HuR binding to the CAT-1 ARE was increased in response to amino acid starvation, resulting in stabilization of the CAT-1 mRNA.

A similar regulation has also been described for regulation of the activating transcription factor 3 (ATF3) transcript by M.S.Kilberg's group. They demonstrated that HuR also interacted with ATF3 mRNA

*in vivo* and that this interaction increased following amino acid starvation [40]. Furthermore, suppression of HuR protein content using RNAi partially blocked the increase in ATF3 mRNA in response to amino acid starvation. Taken together these results demonstrate that an adaptive response of mammalian cells to amino acid starvation involves increased mRNA stability of the target genes mediated by HuR binding to the ARE.

##### 4.2. Translational control of mRNA in response to amino acid starvation

It has been shown that translation of specific genes, involved in regulatory processes, is up-regulated by amino acid starvation. The 5'-UTR of these mRNA contains upstream open reading frames (uORFs) that induce translation when cap-dependent protein synthesis is decreased. This regulatory mechanism was described first in yeast by A. Hinnebusch's laboratory [41] (see [42] for review). In mammals, the translation rate of two transcription factors, activating transcription factors 4 and 5 (ATF4 and ATF5), is up-regulated upon amino acid starvation [43–45]. The regulation of ATF4 will be discussed later in this review.

Another example of amino acid-regulated translation has been demonstrated for CAT-1 mRNA. Besides stabilization of CAT-1 mRNA, M.Hatzoglou and colleagues demonstrated that amino acid depletion initiated molecular events that specifically activated translation of CAT-1 mRNA [46]. They established the presence of an Internal Ribosome Entry Site (IRES) located within the 5'UTR of CAT-1 mRNA. Under conditions of amino acid starvation, translation from this IRES was stimulated. Translation of a small upstream open reading frame (uORF) in the 5' end of CAT-1 mRNA is necessary for this amino acid-dependent translational control. This translation leads to a change in mRNA structure that allows ribosome entry at the IRES, and consequently, selective translation of the CAT-1 coding sequence [47].

Regulation of gene expression by amino acids at translational level can also involve microRNAs (miRNAs). miRNAs have been generally identified as negative regulators of the translation of cellular mRNAs. Filipowicz and colleagues provided evidence that CAT-1 mRNA could

be relieved from miR-122-mediated repression in human hepatoma cells when they are subjected to different types of stress including amino acid starvation [48]. The derepression of CAT-1 mRNA was accompanied by its release from the cytoplasmic processing bodies and its recruitment to polysomes for translation. This process involves binding of HuR to the 3'UTR of CAT-1 mRNA.

#### 4.3. Transcriptional regulation of gene expression by amino acid availability

Most of the information available concerning the regulation of gene transcription by amino acid availability in mammals has been obtained first by studying the expression of the *CHOP* and *ASNS* genes. *CHOP* is a nuclear protein related to the CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) family of transcription factors that dimerizes with other members of its family [49]. *CHOP* gene expression is strongly induced by cellular stress such as ER stress, oxidative stress, or DNA damage [50,51]. *ASNS* is ubiquitously expressed in most mammalian cells and is responsible for the biosynthesis of asparagine from aspartate and glutamine [52]. It has been previously established that the increase in *CHOP* or *ASNS* mRNA following amino acid starvation is mainly due to an increase in the transcription rate [53–55].

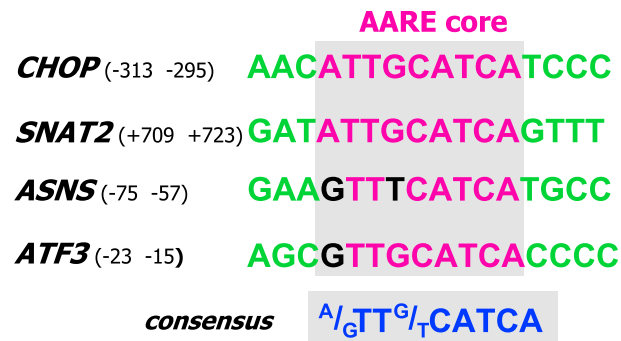
##### 4.3.1. Identification of the Amino Acid Response Element

The amino acid regulation of *CHOP* transcription involves a *cis*-acting element located between –313 and –295 in its promoter that has been named Amino Acid Response Element (AARE) [56]. This element is essential for the induction of *CHOP* transcription by amino acid starvation, and functions as an enhancer element. Its sequence (5'-ATTGCATCA-3') is related to the specific binding sites of two transcription factor families: C/EBP and ATF/CREB.

At the same time, the Kilberg's laboratory identified a sequence in the *ASNS* promoter (between –70 and –62) responsible for its regulation in response to amino acid starvation. This sequence was referred to as the Nutrient-Sensing Response Element-1 (NSRE-1) [57]. Further promoter analysis indicated that a second sequence, 11 nucleotides downstream from NSRE-1, was also required for activation of the *ASNS* promoter by both amino acid starvation and ER stress. This sequence was referred to as NSRE-2. The genomic unit encompassing NSRE-1 and NSRE-2 was named NSRU, for Nutrient-Sensing Response Unit. NSRU is also responsible for the induction of *ASNS* by glucose starvation or Endoplasmic reticulum stress.

Comparison between *CHOP* and *ASNS* transcriptional control elements shows that *ASNS* NSRE-1 and *CHOP* AARE share a nucleotide sequence (Fig. 3). However, certain differences prompted us to think that *CHOP* and *ASNS* induction following amino acid starvation did not occur entirely through a common mechanism [58]: (i) the *CHOP* AARE could function alone whereas *ASNS* NSRE-1 was functionally weak by itself and required the presence of NSRE-2 to amplify NSRE-1 activity. It was necessary to clone several copies of the *ASNS* NSRE-1 in the promoter of a reporter gene to obtain amino acid regulation; (ii) no sequence equivalent to the *ASNS* NSRE-2 site was identified in the vicinity of the *CHOP* AARE; (iii) the amino acid specificity in relation to the degree of induction of these two genes was different [59]; (iv) NSRE-2 conferred a response to ER stress. When cloned downstream of the *CHOP* AARE, *ASNS* NSRE-2 conferred a response of *CHOP* AARE to ER stress [58].

In other amino acid-regulated genes such as *ATF3* [60], and system A amino acid transporter (*SNAT2*) [61], functional sequences that share a high nucleotide sequence similarity with *CHOP* and *ASNS* AARE have also been identified (Fig. 3). All these sequences share a 9 bp core element (5'-<sup>A</sup>/<sub>G</sub>TT<sup>G</sup>/<sub>T</sub>CATCA-3') but they can slightly differ by one or two nucleotides.



**Fig. 3.** *Cis*-acting elements required for induction of *CHOP*, *SNAT2* and *ASNS* genes following amino acid starvation. Sequence comparison of *CHOP* AARE with *ASNS* NSRE-1, *SNAT2* AARE and *ATF3* AARE. The positions of sequences from the transcription start site are shown in brackets. The minimum sequence (core sequence) required for the response to amino acid starvation is in boxes. Identical nucleotides to the *CHOP* sequence are in red. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

##### 4.3.2. Transcription factors binding the AARE

The identified AARE sequences are related to the specific binding sites of two transcription factor families: C/EBP and ATF/CREB. It is therefore logical that many transcription factors that belong, or are related, to these transcription factor families have the ability to bind to this sequence.

**4.3.2.1. *CHOP*-AARE binding proteins.** Several regulatory proteins able to bind *CHOP* AARE have been identified: ATF4, ATF2, Jun Dimerization Protein 2 (JDP2), PCAF, ATF3, ATF7, C/EBP $\beta$ , TRB3 [62–65]. These proteins are involved in modulating *CHOP* transcription in response to amino acid starvation. Among these regulatory proteins, only ATF4 and ATF2 are indispensable for *CHOP* induction by amino acid starvation. Indeed, knockout of either ATF2 or ATF4 abolishes amino acid starvation-induced *CHOP* induction.

**4.3.2.2. *ASNS*-NSRE-1 binding proteins.** The core sequences of *CHOP* AARE and *ASNS* NSRE-1 differ only by two nucleotides (Fig. 3). It is thus expected that a common set of transcription factors bind to both *ASNS*-NSRE-1 and *CHOP* AARE. Indeed, Kilberg and collaborators demonstrated that ATF3, ATF4, C/EBP $\beta$  and several regulatory proteins (TBP, TFII...) bind *ASNS*-NSRE-1. Using a Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) approach they analyzed precisely the time course of interaction between these transcription factors and the *ASNS* promoter [66].

Among the AARE binding proteins, the role of ATF4 and ATF2 has been investigated in detail, then the time course of interaction of the regulatory proteins with *CHOP* AARE will be described.

##### 4.3.3. Role of ATF4 and ATF2 in the control of AARE-dependent transcription

Two sets of AARE regulated genes have been identified. Both are dependent on ATF4 but only one depends on ATF2 for its regulation. For example, regulation of *CHOP* and *ATF3* transcription by leucine starvation depends on the expression of both ATF4 and ATF2, whereas regulation of *ASNS* and *SNAT2* is dependent on ATF4 but not on ATF2 [67,68]. These last genes contain an AARE that is identical or very homologous to *CHOP* or *ATF3* AARE in sequence (Fig. 3), and binds ATF4 but not ATF2. In addition to other data, these results demonstrate that the flanking sequences of the various AARE are important for precise control of AARE-dependent transcription. These differences in mechanism would permit flexibility among amino acid-regulated genes in terms of the rapidity, magnitude and cell specificity of the transcriptional response for the same initial signal.

**4.3.3.1. Role of ATF4 in amino acid control of gene expression.** ATF4 has been shown to be indispensable for amino acid regulation of most of the genes studied [7,60,66,67]. It belongs to the basic region/leucine zipper (bZIP) family of transcription factors that also includes members of the Jun/Fos (AP-1) family [69]. In the case of CHOP and ASNS, it has been shown that (i) the expression of ATF4 and its binding to AARE sequences are increased following amino acid starvation; (ii) in cells devoid of ATF4 expression, induction of CHOP or ASNS upon amino acid starvation is completely lost; (iii) when over-expressed, ATF4 by itself is able to activate the AARE-dependent transcription [70]. However, when acting alone the absolute amount of ectopic ATF4 required to achieve the same degree of transcriptional activation observed after amino acid limitation is greater. These data suggest that other factors may serve to enhance ATF4 functions [70].

**4.3.3.2. Role of ATF2 in amino acid control of gene expression.** ATF2 belongs to the bZIP family of transcription factors and is an important member of activating protein 1 (AP-1) [71]. Its transactivation capacity can be enhanced through phosphorylation of two N-terminal threonine residues Thr-69 and Thr-71 [72–74]. The role of ATF2 in the control of gene expression in response to amino acid starvation has been mainly studied in the context of CHOP regulation [56,62]. It was shown that (i) in cells devoid of ATF2 expression, the induction of CHOP transcription upon amino acid starvation was completely lost; (ii) ATF2 bound to CHOP AARE in both starved and unstarved conditions; (iii) ATF2 phosphorylation was required for the activation of CHOP AARE-dependent transcription. Recently, the role of ATF2 was studied using a chromatin immunoprecipitation (ChIP) approach. In response to amino acid starvation, *in vivo* binding of phospho-ATF2 to CHOP AARE is associated with acetylation of histones H4 and H2B [62] in the vicinity of the AARE sequences. Time course analyses revealed that ATF2 phosphorylation preceded histone acetylation, ATF4 binding, and the increase in CHOP mRNA. Using cells devoid of ATF2 expression, it was also demonstrated that ATF2 was essential for acetylation of histones H4 and H2B in

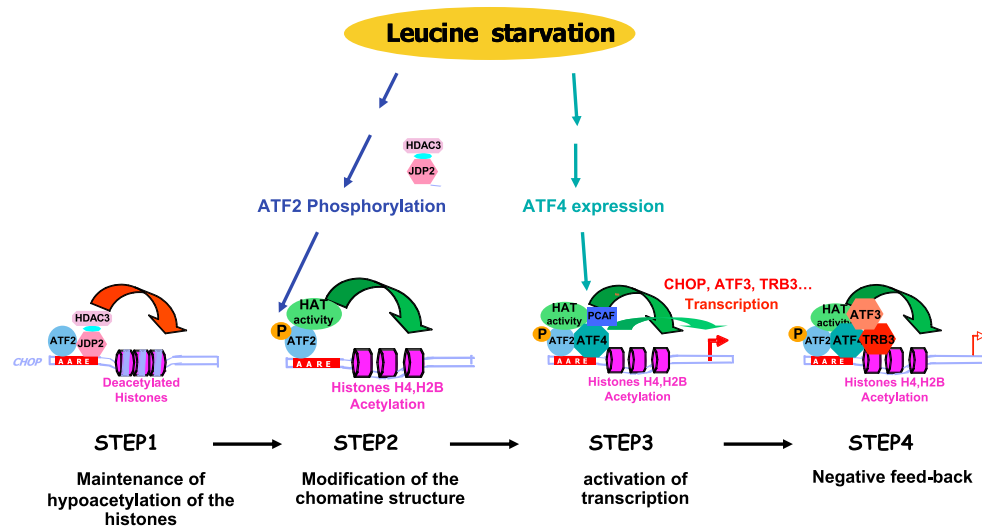
response to amino acid starvation. Phosphorylation of ATF2 has a key role in stimulating histone acetyl transferase (HAT) activity [75,76]. A similar role of ATF2 was also described for regulation of the expression of ATF3 [62] and another set of genes by leucine starvation [67]. Thus, ATF2 appears to be involved in promoting the modification of the chromatin structure to enhance CHOP and ATF3 transcription in response to amino acid starvation.

#### 4.3.4. Kinetics of transcription factor binding to the CHOP promoter during amino acid deprivation

To illustrate the complexity of amino acid regulation of transcription, the kinetics of events that occur at the level of the CHOP AARE sequence in response to leucine starvation was investigated. A ChIP approach allowed the sequence of binding or release of the various transcription factors and regulatory proteins on CHOP AARE to be finely characterized. In addition to ATF2 and ATF4, other regulatory proteins bind directly or indirectly AARE in response to amino acid limitation to finely control gene expression. JDP2, TRB3, PCAF and ATF3 in particular are involved in fine control of CHOP transcription. These data are described with details in Fig. 4.

**4.3.4.1. JDP2.** Jun Dimerization Protein 2 (JDP2) is a bZIP protein that can interact with ATF2. It was reported that JDP2 repressed ATF2-mediated transcription by recruiting histone deacetylase HDAC3 to the promoter of target genes [77]. In a recent study, we showed that JDP2 bound to CHOP AARE in non-starved conditions and that its binding decreased following amino acid starvation. It was suggested that JDP2 acted as a repressor of CHOP transcription [63]. In fed cells, the ability of the AARE-bound JDP2 to recruit HDAC3 could contribute to the silencing of CHOP transcription via maintenance of the hypoacetylation status of histones.

**4.3.4.2. PCAF.** In a recent study, Cherasse et al. [64] identified p300/CBP-associated factor (PCAF) as a novel interaction partner of ATF4. PCAF has been described as a coactivator that mediates transcription of many genes. Like a number of transcriptional coactivators,



**Fig. 4.** Working model for the control of the CHOP gene following amino acid starvation. Based on current knowledge, we propose a working model to depict the proteins thought to play a role in regulating CHOP transcription following amino acid limitation. In fed cells (Step1), the ability of AARE-bound JDP2 to recruit HDAC3 could contribute to the silencing of CHOP transcription via maintenance of the hypoacetylation status of histones. During step2, 0–1 h after amino acid concentration declines, phosphorylation of ATF2 bound on CHOP AARE occurs on two N-terminal threonine residues, Thr-69 and Thr-71. Phosphorylation of this transcription factor may play a key role in stimulating an unidentified histone acetyl transferase (HAT) activity leading to acetylation of histones H4 and H2B. During step3, 30 min–4 h after amino acid decline, ATF4 expression is induced and its binding to AARE increases. ATF4 induction occurs because of the translational control of the existing ATF4 mRNA and takes place within 45 min–1 h of amino acid removal. The presence of AARE-bound ATF4 leads to the recruitment of coactivator PCAF. The binding of these factors leads to the transcription initiation of CHOP and other AARE regulated genes such as TRB3 and ATF3. Then (step4), the ATF3 and TRB3 proteins bind respectively AARE and ATF4 and repress transcription as a negative feed-back process. Taken together, these results show that following amino acid starvation there is a highly coordinated time-dependent program of interaction between a precise set of bZIP transcription factors and AARE leading to transcriptional activation of CHOP and other AARE regulated genes.



this factor possesses an intrinsic histone acetylase activity [78,79]. The role of PCAF has been investigated in multiple studies, and its requirement as a HAT and coactivator has been described for nuclear receptor and growth factor-mediated activation of transcription [80]. PCAF is indeed involved in muscle differentiation [81] and in other processes [82]. Following amino acid starvation, PCAF is a coactivator of ATF4 and is involved in the enhancement of CHOP transcription [64].

**4.3.4.3. TRB3 and ATF3.** TRB3 has a scaffold-like regulatory function for a number of signaling pathways, and in particular it binds and inhibits ATF4 [83,84]. ATF3 is a bZIP transcription factor that binds CHOP AARE and inhibits transcription [85]. These two genes are dramatically induced by amino acid limitation through an ATF4 dependent mechanism [60,86]. TRB3 and ATF3 behave as negative feed-back regulators of ATF4-regulated transcription.

Taken together, these results show that following amino acid deficiency, there is a highly coordinated time-dependent program of interaction between a specific set of transcription factors and the AARE, leading to a very precise transcriptional control of *CHOP*. The longitudinal studies are not really put to the fore in this paragraph. The notion of kinetics needs further development.

#### 4.4. Signaling pathways regulated by amino acid limitation

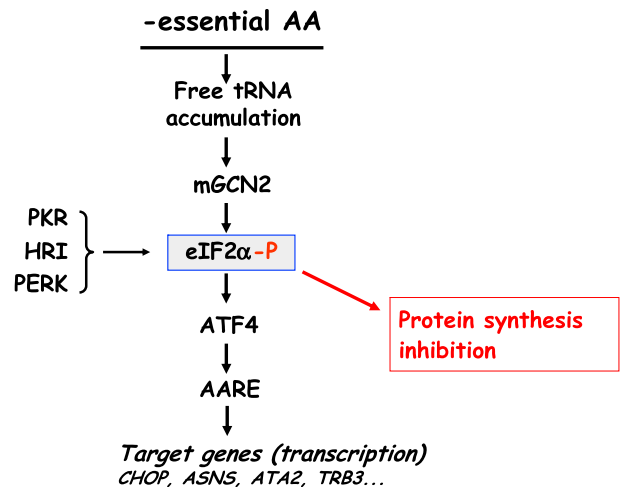
In mammals, the signaling pathways that mediate regulation of gene expression in response to amino acid availability are partially understood. Among the identified pathways, the mammalian target of rapamycin (mTOR) protein kinase has been described to sense nutrients. Signaling downstream of mTOR is implicated in many aspects of cell growth including cell cycle control and ribosome biogenesis. mTOR activates both ribosomal p70 S6 kinase (S6K1) and the mRNA cap-binding protein inhibitory protein, 4E-BP1 [87,88]. In response to amino acid limitation, this signaling pathway is down-regulated. The roles and functions of the mTOR pathway is not developed further in the present article, however many recent reviews are available on this topic [8,87,88].

##### 4.4.1. The GCN2/ATF4 pathway (the AAR pathway)

In response to amino acid starvation, activation of the GCN2/ATF4 pathway has been well described at molecular level. A second pathway leading to ATF2 phosphorylation has recently been identified.

In mammals, limiting the extracellular supply of an essential amino acid or blocking the synthesis of an otherwise non-essential one results in activation of a signal transduction pathway that is referred to as the Amino Acid Response (AAR). D. Ron's group identified this signaling pathway for regulating gene expression in mammals [36]. The AAR is homologous to the well-characterized yeast general control response to amino acid deprivation [89]. Its components include the mammalian homologue of GCN2 kinase, the initiation factor of translation eIF2 $\alpha$  and ATF4 (Fig. 5). The initial step in AAR is activation by uncharged tRNA of mammalian GCN2 protein kinase, which phosphorylates eIF2 $\alpha$  on serine 51 [89]. This phosphorylation decreases the cap-dependent translation of most mRNAs. Like the GCN4 transcript, ATF4 mRNA contains uORFs in its 5'UTR that allow translation when cap-dependent translation is inhibited (see [43,44] for the molecular mechanisms). Therefore, under circumstances of amino acid starvation, transcription factor ATF4 is translationally up-regulated. Once induced, ATF4 directly or indirectly induces transcription of specific target genes such as *ASNS* and *CHOP*.

A recent study [35] showed the importance of the cellular context in GCN2 regulation of gene expression. Comparison between myoblasts and myotubes revealed that the GCN2 pathway is much less activated by amino acid starvation in myotubes than in myoblasts. An amino acid supply from intracellular proteolysis could contribute



**Fig. 5.** The mammalian GCN2/ATF4 signaling pathway. The signal transduction pathway triggered in response to amino acid starvation is referred to as the amino acid response (AAR). The initial step in AAR is activation by uncharged tRNAs of GCN2 kinase which phosphorylates the  $\alpha$  subunit of translation initiation factor eIF2 (eIF2 $\alpha$ ) on serine 51. This phosphorylation decreases protein synthesis by inhibiting the formation of the pre-initiation complex. However, eIF2 $\alpha$  phosphorylation also triggers the translation of specific mRNAs including ATF4. Once induced, ATF4 induces transcription of specific target genes such as *CHOP*, *ASNS*, *TRB3* or *ATF3*. In mammals, three other eIF2 $\alpha$  kinases leading to ATF4 expression have been identified: PKR (activated by double-stranded RNA during viral infection), HRI (activated by heme deficiency), and PERK (activated by protein load in the endoplasmic reticulum).

to non-activation of the GCN2 pathway by amino acid starvation in myotubes [90]. However, it cannot be excluded that additional mechanisms such as the occurrence of regulatory partner(s), like IMPACT [91], might be involved in GCN2 inhibition in myotubes.

##### 4.4.2. Signaling pathway leading to ATF2 phosphorylation

Several published data (described above) establish that, in response to amino acid starvation, (i) ATF2 phosphorylation on Thr-69 and Thr-71 [67] is induced and (ii) phosphorylation of ATF2 plays a key role in stimulating transcription of specific genes [62]. Collectively, these data demonstrate the existence of a specific amino acid-regulated pathway leading to phosphorylation of ATF2. This pathway was partially identified recently [92]. We first showed that the MAPK module MEKK1/MKK7/JNK2 is responsible for ATF2 phosphorylation in response to leucine starvation. Then we progressed backwards up the signal transduction pathway and showed that GTPase Rac1/Cdc42 and protein G $\alpha$ 12 control the MAPK module, ATF2 phosphorylation and AARE-dependent transcription.

##### 4.4.3. Other signaling pathways

In yeast, the mechanisms involved in amino acid detection have been well documented [93] and several signaling pathways identified. By homology to yeast we can imagine that pathways other than mTOR and mGCN2 are involved in sensing amino acid availability in mammals.

Data from the Kilberg's group [94] reveal that there is a quantitative difference in the response of gene expression to deprivation of different amino acids. When HepG2 cells were deprived of one of the essential amino acids, p-eIF2 $\alpha$  and ATF4 were increased, but the correlation with the induction of gene expression was relatively weak. They also demonstrated that activation of AARE-driven transcription can be triggered by a deficiency in any one of the essential amino acids, but the response is not uniform.

These conclusions were recently reinforced by the data of Deval et al. [35]. Using transcription profiling from cells devoid of GCN2 expression, they demonstrated that, in addition to the GCN2/ATF4

pathway, other signaling mechanisms could be involved in the up- and down-regulation of gene expression in response to amino acid limitation. A series of GCN2-independent genes regulated at the transcriptional (Egr1, Cxcl10, etc) and post-transcriptional levels (Dusp16, etc) by amino acid starvation have been identified. We can expect that amino acids could interfere directly or indirectly with signaling pathways and/or various transcription factors distinct from AAR. In particular, it was shown that glutamine, the most abundant amino acid, modulated activity of various transcription factors through mechanisms that remain to be identified (see [95] for review). Hence we can conclude here that the response to amino acid starvation in mammals is a complex process that involves different regulatory processes.

## 5. Control of physiological function by the GCN2/ATF4 pathway

In this chapter we focus on the role the GCN2/ATF4 pathway plays in the control of several physiological functions.

### 5.1. Amino acid deficiency sensing by GCN2 triggers food aversion

In omnivorous animals, food intake is the result of a complex behavioral pattern in which innate factors play an important role. A remarkable example of an innate mechanism governing food choice is presented by the fact that animals consume substantially less of an otherwise identical experimental meal lacking a single essential amino acid (see above). Blood concentration of an essential amino acid decreases rapidly when this amino acid is missing in the diet. Previous studies reported that the anterior piriform cortex (APC) is involved in the detection of the amino acid limitation and in the control of food intake according to amino acid levels [22,24,96,97].

Recent results [98,99] established that the aversive response of wild-type mice to a diet deficient in one essential amino acid was likewise blunted in GCN2<sup>-/-</sup> mice whereas serum amino acid levels were decreased to similar levels by the imbalanced diet in both genotypes. These results indicated the occurrence of an altered response to amino acid deficiency in mice lacking GCN2 activity. Using conditional GCN2 knockout mice, it was further demonstrated that GCN2 ablation specifically in the brain also impaired the aversive response to an imbalanced diet. Thus, even if the consumption of an imbalanced meal also activates GCN2 in peripheral tissues, this observation implicates brain GCN2 signaling in initiating the aversive response. Therefore, GCN2 appears to be an important sensor of amino acid homeostasis, by activating downstream rectifying responses.

### 5.2. Role of GCN2 in the regulation of fatty-acid homeostasis during leucine deprivation

Whereas the mechanisms involved in short-term adaptation to an imbalanced diet have been well studied (see above), long-term adaptation is poorly understood. A recent study by Guo and Cavener [100] brought to light the role of GCN2 in the regulation of lipid metabolism in the liver during deprivation of an indispensable amino acid. These authors showed that expression of lipogenic genes in the liver were repressed and lipid stores in adipose tissue were mobilized upon leucine deprivation. In contrast, GCN2 deficient mice developed liver steatosis and exhibited reduced lipid mobilization. Liver steatosis in GCN2<sup>-/-</sup> mice was found to be caused by unrepressed expression of lipogenic genes, including Srebp-1c. The signaling pathway linking GCN2 activity to the regulation of Srebp-1c expression is not entirely identified at present.

Until now, the controls of lipid and protein metabolism were considered to be relatively independent. These data give a glimpse

of integrated regulation mechanisms taking variations in the availability of diverse types of nutrients into account simultaneously. A recent publication [101] suggested that variations in protein supply in food could affect GCN2 basal activity in the liver. Therefore, GCN2 could regulate several aspects of metabolism in a larger number of nutritional situations than simply in response to an imbalanced diet.

In the same way, two recent articles demonstrated that phosphorylation of eIF2 $\alpha$  was a key regulator of several aspects of intermediary metabolism. Oyadomari et al. [102] demonstrated that eIF2 $\alpha$ -P signaling in the liver was regulating transcription factors involved in carbohydrate and lipid metabolism. The Kaufman's group showed that translation attenuation through eIF2 $\alpha$  phosphorylation prevented oxidative stress and optimized ER protein folding to support insulin production in pancreatic  $\beta$  cells [103].

### 5.3. Role of GCN2 in the regulation of neuronal plasticity

Studies on various forms of synaptic plasticity have shown a link between messenger RNA translation, learning and memory [104]. Costa-Mattioli et al. [105,106] provided evidence that GCN2 regulates synaptic plasticity, as well as learning and memory. The molecular basis for enhanced memory in GCN2<sup>-/-</sup> mice with reduced eIF2 $\alpha$  phosphorylation is explained by the fact that GCN2 mediated eIF2 $\alpha$  phosphorylation causes an increase in translation of ATF4 mRNA in the brain. ATF4 suppresses memory because it inhibits transcription factor CREB (c-AMP response element binding protein)-mediated gene expression. In these studies, the role of a lack of GCN2 activity is clearly established; however the role of modulation of GCN2 activity in the brain of wild-type mice by various factors remains to be addressed.

### 5.4. Role of GCN2 in the immune system

It was shown recently that the Amino Acid Response (AAR) pathway was involved in several aspects of regulation of the immune response [107–109]. In particular, associated with the induction of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), AAR is involved in communication between cells. For example, mononuclear cells that synthesize IDO reduce extracellular tryptophan concentrations so that adjacent T-cells, which depend on tryptophan from the extracellular environment, are unable to activate and proliferate upon encountering antigens. Therefore IDO might play a role in preventing the initiation of autoimmune disease by enforcing T-cell tolerance by suppressing their proliferation [110]. Hence, high local expression of IDO by mononuclear cells may represent an anti-inflammatory and immunosuppressive mechanism attempting to counterbalance tissue damage [111]. In addition, IDO/GCN2 activities are implicated in several physiological contexts, such as the inhibition of maternal T-cell immunity to fetal tissues during mammalian gestation [112] and T-cell tolerance to tumors [113,114].

Recently these conclusions were reinforced by Sundrud et al. [115] who demonstrated that the molecule halofuginone (HF) selectively inhibited T.helper17 (Th17) differentiation by activating the AAR pathway through GCN2 activation. Inhibition of Th17 differentiation by HF is rescued by addition of an excess of amino acids and is mimicked by AAR activation upon amino acid depletion. These results indicate that the AAR pathway is a potent and selective regulator of inflammatory cell differentiation in vivo. Th17 cells have emerged as important and broad mediators of autoimmunity.

## 6. Conclusion

The understanding of the role of amino acids as signaling molecules in mammalian cells remains relatively limited, but

significant progress has been achieved during the past few years, in particular with regard to amino acid control of physiological functions. In the near future it will be necessary, firstly, to identify the extent of the genetic program controlled by amino acid availability and the underlying molecular mechanism, then to rely on physiological observations of molecular events described *in vitro* to improve our knowledge of the physiological consequences of nutritional status.

The molecular basis of gene regulation by dietary protein intake is an important field of research for study of the regulation of physiological functions of individuals living under conditions of restricted, imbalanced, or excessive food intake. Beyond gaining a basic understanding of the amino acid control of biological mechanisms, the characterization of how these processes contribute to the pathology of various diseases represents an important field of investigation in molecular nutrition.

## References

- [1] E. Duplus, M. Glorian, C. Forest, Fatty acid regulation of gene transcription. *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 30749–30752.
- [2] P.A. Grimaldi, Fatty acid regulation of gene expression. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 4 (2001) 433–437.
- [3] J.P. Pégiorier, Regulation of gene expression by fatty acids. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 1 (1998) 329–334.
- [4] H.C. Towle, Metabolic regulation of gene transcription in mammals. *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 23235–23238.
- [5] S. Vaulont, M. Vasseur-Cognet, A. Kahn, Glucose regulation of gene transcription. *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 31555–31558.
- [6] C. Jousse, J. Averous, A. Bruhat, V. Carraro, S. Mordier, P. Fafournoux, Amino acids as regulators of gene expression: molecular mechanisms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313 (2004) 447–452.
- [7] M.S. Kilberg, Y.X. Pan, H. Chen, V. Leung-Pineda, Nutritional control of gene expression: how mammalian cells respond to amino acid limitation. *Annu. Rev. Nutr.* 25 (2005) 59–85.
- [8] S.R. Kimball, L.S. Jefferson, Amino acids as regulators of gene expression. *Nutr. Metab. (Lond)* 1 (2004) 3.
- [9] T.T. Aoki, M.F. Brennan, W.A. Muller, J.S. Soeldner, J.S. Alpert, S.B. Saltz, R.L. Kaufmann, M.H. Tan, G.F. Cahill Jr., Amino acid levels across normal forearm muscle and splanchnic bed after a protein meal. *Am. J. Clin. Nutr.* 29 (1976) 340–350.
- [10] P. Fafournoux, C. Remesy, C. Demigne, Fluxes and membrane transport of amino acids in rat liver under different protein diets. *Am. J. Physiol.* 259 (1990) E614–E625.
- [11] H.N. Munro, *Mammalian Protein Metabolism*, vol. 4, Academic press, New York and London, 1970.
- [12] V.R. Young, A.E. El-Khoury, S. Melchor, L. Castillo, The biochemistry and physiology of protein and amino acid metabolism, with reference to protein nutrition. in: C.R.R. Niels (Ed.), *Protein Metabolism During Infancy*. Nestec Ltd., Vevey/ Raven Press Ltd., New York, 1994, pp. 1–28.
- [13] F. Yoshizawa, H. Endo, H. Ide, K. Yagasaki, R. Funabiki, Translational regulation of protein synthesis in the liver and skeletal muscle of mice in response to refeeding. *Nutr. Biochem.* 6 (1995) 130–136.
- [14] E. Svanberg, L.S. Jefferson, K. Lundholm, S.R. Kimball, Postprandial stimulation of muscle protein synthesis is independent of changes in insulin. *Am. J. Physiol.* 272 (1997) E841–E847.
- [15] J.M. Baertl, R.P. Placko, G.G. Graham, Serum proteins and plasma free amino acids in severe malnutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 27 (1974) 733–742.
- [16] R.F. Grimble, R.G. Whitehead, Fasting serum-aminoacid patterns in kwashiorkor and after administration of different levels of protein. *Lancet* 1 (1970) 918–920.
- [17] P.D. Lee, C.A. Conover, D.R. Powell, Regulation and function of insulin-like growth factor-binding protein-1. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 204 (1993) 4–29.
- [18] D.S. Straus, Nutritional regulation of hormones and growth factors that control mammalian growth. *Faseb J.* 8 (1994) 6–12.
- [19] D.S. Straus, E.J. Burke, N.W. Marten, Induction of insulin-like growth factor binding protein-1 gene expression in liver of protein-restricted rats and in rat hepatoma cells limited for a single amino acid. *Endocrinology* 132 (1993) 1090–1100.
- [20] C. Jousse, A. Bruhat, M. Ferrara, P. Fafournoux, Physiological concentration of amino acids regulates insulin-like-growth-factor-binding protein 1 expression. *Biochem. J.* 334 (1998) 147–153.
- [21] J. Averous, A.C. Maurin, A. Bruhat, C. Jousse, C. Arliguie, P. Fafournoux, Induction of IGFBP-1 expression by amino acid deprivation of HepG2 human hepatoma cells involves both a transcriptional activation and an mRNA stabilization due to its 3'UTR. *FEBS Lett.* 579 (2005) 2609–2614.
- [22] D.W. Gietzen, Neural mechanisms in the responses to amino acid deficiency. *J. Nutr.* 123 (1993) 610–625.
- [23] Q.R. Rogers, P.M.B. Leung, The control of food intake: when and how are amino acids involved?, vol. 213, Academic press, New York, 1977, 213p.
- [24] P.M. Leung, Q.R. Rogers, Importance of prepyriform cortex in food-intake response of rats to amino acids. *Am. J. Physiol.* 221 (1971) 929–935.
- [25] P.M. Leung, Q.R. Rogers, A.E. Harper, Effect of amino acid imbalance on dietary choice in the rat. *J. Nutr.* 95 (1968) 483–492.
- [26] D.W. Gietzen, Amino Acid Recognition in the Central Nervous System. CRC Press, Boca-Raton, London, New York, Washington, 2000, pp. 339–357.
- [27] R.R. Wolfe, F. Jahoor, W.H. Hartl, Protein and amino acid metabolism after injury. *Diabetes Metab. Rev.* 5 (1989) 149–164.
- [28] T.R. Ziegler, C. Gatzert, D.W. Wilmore, Strategies for attenuating protein-catabolic responses in the critically ill. *Annu. Rev. Med.* 45 (1994) 459–480.
- [29] M. Jeevanandam, G.D. Horowitz, S.F. Lowry, M.F. Brennan, Cancer cachexia and protein metabolism. *Lancet* 1 (1984) 1423–1426.
- [30] G. Biolo, G. Toigo, B. Ciocchi, R. Situlin, F. Iscra, A. Gullo, G. Guarnieri, Metabolic response to injury and sepsis: changes in protein metabolism. *Nutrition* 13 (1997) 52S–57S.
- [31] C. Obled, I. Papet, D. Breuille, Metabolic bases of amino acid requirements in acute diseases. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 5 (2002) 189–197.
- [32] J. Le Boucher, L. Cynober, Protein metabolism and therapy in burn injury. *Ann. Nutr. Metab.* 41 (1997) 69–82.
- [33] S.S. Gong, L. Guerrini, C. Basilico, Regulation of asparagine synthetase gene expression by amino acid starvation. *Mol. Cell. Biol.* 11 (1991) 6059–6066.
- [34] T. Peng, T.R. Golub, D.M. Sabatini, The immunosuppressant rapamycin mimics a starvation-like signal distinct from amino acid and glucose deprivation. *Mol. Cell. Biol.* 22 (2002) 5575–5584.
- [35] C. Deval, C. Chaveroux, A.C. Maurin, Y. Cherasse, L. Parry, V. Carraro, D. Milenkovic, M. Ferrara, A. Bruhat, C. Jousse, P. Fafournoux, Amino acid limitation regulates the expression of genes involved in several specific biological processes through GCN2-dependent and GCN2-independent pathways. *FEBS J.* 276 (2009) 707–718.
- [36] H.P. Harding, Y. Zhang, H. Zeng, I. Novoa, P.D. Lu, M. Calfon, N. Sadri, C. Yun, B. Popko, R. Paules, D.F. Stojdl, J.C. Bell, T. Hettmann, J.M. Leiden, D. Ron, An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol. Cell.* 11 (2003) 619–633.
- [37] M. Hatzoglou, J. Fernandez, I. Yaman, E. Closs, Regulation of cationic amino acid transport: the story of the CAT-1 transporter. *Annu. Rev. Nutr.* 24 (2004) 377–399.
- [38] C.M. Brennan, J.A. Steitz, HuR and mRNA stability. *Cell. Mol. Life Sci.* 58 (2001) 266–277.
- [39] I. Yaman, J. Fernandez, B. Sarkar, R.J. Schneider, M.D. Snider, L.E. Nagy, M. Hatzoglou, Nutritional control of mRNA stability is mediated by a conserved AU-rich element that binds the cytoplasmic shuttling protein HuR. *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 41539–41546.
- [40] Y.X. Pan, H. Chen, M.S. Kilberg, Interaction of RNA-binding proteins HuR and AUF1 with the human ATF3 mRNA 3'-untranslated region regulates its amino acid limitation-induced stabilization. *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 34609–34616.
- [41] T.E. Dever, L. Feng, R.C. Wek, A.M. Cigan, T.F. Donahue, A.G. Hinnebusch, Phosphorylation of initiation factor 2 alpha by protein kinase GCN2 mediates gene-specific translational control of GCN4 in yeast. *Cell* 68 (1992) 585–596.
- [42] A.G. Hinnebusch, Translational control of GCN4: an in vivo barometer of initiation factor activity. *Trends Biochem. Sci.* 19 (1994) 409–414.
- [43] K.M. Vattam, R.C. Wek, Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 11269–11274.
- [44] P.D. Lu, H.P. Harding, D. Ron, Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. *J. Cell. Biol.* 167 (2004) 27–33.
- [45] Y. Watatani, K. Ichikawa, N. Nakanishi, M. Fujimoto, H. Takeda, N. Kimura, H. Hirose, S. Takahashi, Y. Takahashi, Stress-induced translation of ATF5 mRNA is regulated by the 5'-untranslated region. *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 2543–2553.
- [46] J. Fernandez, I. Yaman, P. Sarnow, M.D. Snider, M. Hatzoglou, Regulation of internal ribosomal entry site-mediated translation by phosphorylation of the translation initiation factor eIF2alpha. *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 19198–19205.
- [47] I. Yaman, J. Fernandez, H. Liu, M. Caprara, A.A. Komar, A.E. Koromilas, L. Zhou, M.D. Snider, D. Scheuner, R.J. Kaufman, M. Hatzoglou, The zipper model of translational control: a small upstream ORF is the switch that controls structural remodeling of an mRNA leader. *Cell* 113 (2003) 519–531.
- [48] S.N. Bhattacharyya, R. Habermacher, U. Martine, E.I. Closs, W. Filipowicz, Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell* 125 (2006) 1111–1124.
- [49] D. Ron, J.F. Habener, CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes Dev.* 6 (1992) 439–453.
- [50] S.L. Sylvester, C.M. ap Rhys, J.D. Luethy-Martindale, N.J. Holbrook, Induction of GADD153, a CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)-related gene, during the acute phase response in rats. Evidence for the involvement of C/EBPs in regulating its expression [published erratum appears in *J Biol Chem* 1995 Jun 16;270 (24):14842]. *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 20119–20125.
- [51] J.D. Luethy, N.J. Holbrook, Activation of the gadd153 promoter by genotoxic agents: a rapid and specific response to DNA damage. *Cancer Res.* 52 (1992) 5–10.

- [52] I.L. Andrusis, J. Chen, P.N. Ray, Isolation of human cDNAs for asparagine synthetase and expression in Jensen rat sarcoma cells. *Mol. Cell. Biol.* 7 (1987) 2435–2443.
- [53] L. Guerrini, S.S. Gong, K. Mangasarian, C. Basilico, Cis- and trans-acting elements involved in amino acid regulation of asparagine synthetase gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 13 (1993) 3202–3212.
- [54] R.G. Hutson, M.S. Kilberg, Cloning of rat asparagine synthetase and specificity of the amino acid-dependent control of its mRNA content. *Biochem. J.* 304 (1994) 745–750.
- [55] A. Bruhat, C. Jousse, X.Z. Wang, D. Ron, M. Ferrara, P. Fafournoux, Amino acid limitation induces expression of CHOP, a CCAAT/enhancer binding protein-related gene, at both transcriptional and post-transcriptional levels. *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 17588–17593.
- [56] A. Bruhat, C. Jousse, V. Carraro, A.M. Reimold, M. Ferrara, P. Fafournoux, Amino acids control mammalian gene transcription: activating transcription factor 2 is essential for the amino acid responsiveness of the CHOP promoter. *Mol. Cell. Biol.* 20 (2000) 7192–7204.
- [57] I.P. Barbosa-Tessmann, C. Chen, C. Zhong, F. Siu, S.M. Schuster, H.S. Nick, M.S. Kilberg, Activation of the human asparagine synthetase gene by the amino acid response and the endoplasmic reticulum stress response pathways occurs by common genomic elements. *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 26976–26985.
- [58] A. Bruhat, J. Averous, V. Carraro, C. Zhong, A.M. Reimold, M.S. Kilberg, P. Fafournoux, Differences in the molecular mechanisms involved in the transcriptional activation of chop and asparagine synthetase in response to amino acid deprivation or activation of the unfolded protein response. *J. Biol. Chem.* 25 (2002) 25.
- [59] C. Jousse, A. Bruhat, M. Ferrara, P. Fafournoux, Evidence for multiple signaling pathways in the regulation of gene expression by amino acids in human cell lines. *J. Nutr.* 130 (2000) 1555–1560.
- [60] Y.X. Pan, H. Chen, M.M. Thiaville, M.S. Kilberg, Activation of the ATF3 gene through a co-ordinated amino acid-sensing response programme that controls transcriptional regulation of responsive genes following amino acid limitation. *Biochem. J.* 401 (2007) 299–307.
- [61] S.S. Palii, H. Chen, M.S. Kilberg, Transcriptional control of the human sodium coupled neutral amino acid transporter system A gene by amino acid availability is mediated by an intronic element. *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 3463–3471.
- [62] A. Bruhat, Y. Cherasse, A.C. Maurin, W. Breitwieser, L. Parry, C. Deval, N. Jones, C. Jousse, P. Fafournoux, ATF2 is required for amino acid-regulated transcription by orchestrating specific histone acetylation. *Nucleic Acids Res.* 35 (2007) 1312–1321.
- [63] Y. Cherasse, C. Chaveroux, C. Jousse, A.C. Maurin, V. Carraro, L. Parry, P. Fafournoux, A. Bruhat, Role of the repressor JDP2 in the amino acid-regulated transcription of CHOP. *FEBS Lett.* 582 (2008) 1537–1541.
- [64] Y. Cherasse, A.C. Maurin, C. Chaveroux, C. Jousse, V. Carraro, L. Parry, C. Deval, C. Chambon, P. Fafournoux, A. Bruhat, The p300/CBP-associated factor (PCAF) is a cofactor of ATF4 for amino acid-regulated transcription of CHOP. *Nucleic Acids Res.* 35 (2007) 5954–5965.
- [65] A. Bruhat, Y. Cherasse, C. Chaveroux, A.C. Maurin, C. Jousse, P. Fafournoux, Amino acids as regulators of gene expression in mammals: molecular mechanisms. *Biofactors* 35 (2009) 249–257.
- [66] H. Chen, Y.X. Pan, E.E. Dudenhausen, M.S. Kilberg, Amino acid deprivation induces the transcription rate of the human asparagine synthetase gene through a timed program of expression and promoter binding of nutrient-responsive basic region/leucine zipper transcription factors as well as localized histone acetylation. *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 50829–50839.
- [67] J. Averous, A. Bruhat, C. Jousse, V. Carraro, G. Thiel, P. Fafournoux, Induction of CHOP expression by amino acid limitation requires both ATF4 expression and ATF2 phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 5288–5297.
- [68] S.S. Palii, M.M. Thiaville, Y.X. Pan, C. Zhong, M.S. Kilberg, Characterization of the amino acid response element within the human sodium-coupled neutral amino acid transporter 2 (SNAT2) System A transporter gene. *Biochem. J.* 395 (2006) 517–527.
- [69] B.A. Karpinski, G.D. Morle, J. Huggenvik, M.D. Uhler, J.M. Leiden, Molecular cloning of human CREB-2: an ATF/CREB transcription factor that can negatively regulate transcription from the cAMP response element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 4820–4824.
- [70] J. Shan, D. Ord, T. Ord, M.S. Kilberg, Elevated ATF4 expression, in the absence of other signals, is sufficient for transcriptional induction via CCAAT enhancer-binding protein-inactivating transcription factor response elements. *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 21241–21248.
- [71] H. van Dam, M. Castellazzi, Distinct roles of Jun:Fos and Jun:ATF dimers in oncogenesis. *Oncogene* 20 (2001) 2453–2464.
- [72] C. Livingstone, G. Patel, N. Jones, ATF-2 contains a phosphorylation-dependent transcriptional activation domain. *Embo. J.* 14 (1995) 1785–1797.
- [73] D.M. Ouwens, N.D. de Ruiter, G.C. van der Zon, A.P. Carter, J. Schouten, C. van der Burgt, K. Kooistra, J.L. Bos, J.A. Maassen, H. van Dam, Growth factors can activate ATF2 via a two-step mechanism: phosphorylation of Thr71 through the Ras-MEK-ERK pathway and of Thr69 through RafGDS-Src-p38. *Embo. J.* 21 (2002) 3782–3793.
- [74] W. Breitwieser, S. Lyons, A.M. Flenniken, G. Ashton, G. Bruder, M. Willington, G. Lacaud, V. Kouskoff, N. Jones, Feedback regulation of p38 activity via ATF2 is essential for survival of embryonic liver cells. *Genes Dev.* 21 (2007) 2069–2082.
- [75] H. Kawasaki, L. Schiltz, R. Chiu, K. Itakura, K. Taira, Y. Nakatani, K.K. Yokoyama, ATF-2 has intrinsic histone acetyltransferase activity which is modulated by phosphorylation. *Nature* 405 (2000) 195–200.
- [76] A. Bhoumik, Z. Ronai, ATF2: a transcription factor that elicits oncogenic or tumor suppressor activities. *Cell Cycle* 7 (2008) 2341–2345.
- [77] C. Jin, H. Li, T. Murata, K. Sun, M. Horikoshi, R. Chiu, K.K. Yokoyama, JDP2, a repressor of AP-1, recruits a histone deacetylase 3 complex to inhibit the retinoic acid-induced differentiation of F9 cells. *Mol. Cell. Biol.* 22 (2002) 4815–4826.
- [78] X.J. Yang, V.V. Ogryzko, J. Nishikawa, B.H. Howard, Y. Nakatani, A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature* 382 (1996) 319–324.
- [79] S.L. Berger, Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12 (2002) 142–148.
- [80] J.C. Blanco, S. Minucci, J. Lu, X.J. Yang, K.K. Walker, H. Chen, R.M. Evans, Y. Nakatani, K. Ozato, The histone deacetylase PCAF is a nuclear receptor coactivator. *Genes Dev.* 12 (1998) 1638–1651.
- [81] P.L. Puri, V. Sartorelli, X.J. Yang, Y. Hamamori, V.V. Ogryzko, B.H. Howard, L. Kedes, J.Y. Wang, A. Graessmann, Y. Nakatani, M. Levrero, Differential roles of p300 and PCAF acetyltransferases in muscle differentiation. *Mol. Cell.* 1 (1997) 35–45.
- [82] E. Korzus, J. Torchia, D.W. Rose, L. Xu, R. Kurokawa, E.M. McNerney, T.M. Mullen, C.K. Glass, M.G. Rosenfeld, Transcription factor-specific requirements for coactivators and their acetyltransferase functions. *Science* 279 (1998) 703–707.
- [83] D. Ord, T. Ord, Mouse NIPK interacts with ATF4 and affects its transcriptional activity. *Exp. Cell. Res.* 286 (2003) 308–320.
- [84] D. Ord, T. Ord, Characterization of human NIPK (TRB3, SKIP3) gene activation in stressful conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330 (2005) 210–218.
- [85] C.D. Wolfgang, B.P. Chen, J.L. Martindale, N.J. Holbrook, T. Hai, gadd153/Chop10, a potential target gene of the transcriptional repressor ATF3. *Mol. Cell. Biol.* 17 (1997) 6700–6707.
- [86] C. Jousse, C. Deval, A.C. Maurin, L. Parry, Y. Cherasse, C. Chaveroux, R. Lefloch, P. Lenormand, A. Bruhat, P. Fafournoux, TRB3 inhibits the transcriptional activation of stress regulated genes by a negative feedback on the ATF4 pathway. *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 15851–15861.
- [87] C.G. Proud, Amino acids and mTOR signalling in anabolic function. *Biochem. Soc. Trans.* 35 (2007) 1187–1190.
- [88] J.H. Reiling, D.M. Sabatini, Stress and mTOR signaling. *Oncogene* 25 (2006) 6373–6383.
- [89] R.C. Wek, H.Y. Jiang, T.G. Anthony, Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem. Soc. Trans.* 34 (2006) 7–11.
- [90] R.M. Vabulas, F.U. Hartl, Protein synthesis upon acute nutrient restriction relies on proteasome function. *Science* 310 (2005) 1960–1963.
- [91] C.M. Pereira, E. Sattlegger, H.Y. Jiang, B.M. Longo, C.B. Jaqueta, A.G. Hinnebusch, R.C. Wek, L.E. Mello, B.A. Castilho, IMPACT, a protein preferentially expressed in the mouse brain, binds GCN1 and inhibits GCN2 activation. *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 28316–28323.
- [92] C. Chaveroux, C. Jousse, Y. Cherasse, A.C. Maurin, L. Parry, V. Carraro, B. Derijard, A. Bruhat, P. Fafournoux, Identification of a novel amino acid response pathway triggering ATF2 phosphorylation in mammals. *Mol. Cell. Biol.* 29 (2009) 6515–6526.
- [93] A.G. Hinnebusch, Mechanisms of gene regulation in the general control of amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 52 (1988) 248–273.
- [94] S.S. Palii, C.E. Kays, C. Deval, A. Bruhat, P. Fafournoux, M.S. Kilberg, Specificity of amino acid regulated gene expression: analysis of genes subjected to either complete or single amino acid deprivation. *Amino Acids* 37 (2009) 79–88.
- [95] C. Brasse-Lagnel, A. Lavoine, A. Husson, Control of mammalian gene expression by amino acids, especially glutamine. *FEBS J.* 276 (2009) 1826–1844.
- [96] A.E. Harper, N.J. Benevenga, R.M. Wohlhueter, Effects of ingestion of disproportionate amounts of amino acids. *Physiol. Rev.* 50 (1970) 428–558.
- [97] D.W. Gietzen, C.M. Ross, S. Hao, J.W. Sharp, Phosphorylation of eIF2alpha is involved in the signaling of indispensable amino acid deficiency in the anterior piriform cortex of the brain in rats. *J. Nutr.* 134 (2004) 717–723.
- [98] A.C. Maurin, C. Jousse, J. Averous, L. Parry, A. Bruhat, Y. Cherasse, H. Zeng, Y. Zhang, H.P. Harding, D. Ron, P. Fafournoux, The GCN2 kinase biases feeding behavior to maintain amino acid homeostasis in omnivores. *Cell. Metab.* 1 (2005) 273–277.
- [99] S. Hao, J.W. Sharp, C.M. Ross-Inta, B.J. McDaniel, T.G. Anthony, R.C. Wek, D.R. Cavener, B.C. McGrath, J.B. Rudell, T.J. Koehnle, D.W. Gietzen, Uncharged tRNA and sensing of amino acid deficiency in mammalian piriform cortex. *Science* 307 (2005) 1776–1778.
- [100] F. Guo, D.R. Cavener, The GCN2 eIF2alpha kinase regulates fatty-acid homeostasis in the liver during deprivation of an essential amino acid. *Cell. Metab.* 5 (2007) 103–114.
- [101] N. Chotechuang, D. Azzout-Marniche, C. Bos, C. Chaumontet, N. Gausseres, T. Steiler, C. Gaudichon, D. Tome, mTOR, AMPK, and GCN2 coordinate the adaptation of hepatic energy metabolic pathways in response to protein intake in the rat. *Am. J. Physiol.* 297 (2009) E1313–E1323.
- [102] S. Oyadomari, H.P. Harding, Y. Zhang, M. Oyadomari, D. Ron, Dephosphorylation of translation initiation factor 2alpha enhances glucose tolerance and attenuates hepatosteatosis in mice. *Cell. Metab.* 7 (2008) 520–532.



- [103] S.H. Back, D. Scheuner, J. Han, B. Song, M. Ribick, J. Wang, R.D. Gildersleeve, S. Pennathur, R.J. Kaufman, Translation attenuation through eIF2alpha phosphorylation prevents oxidative stress and maintains the differentiated state in beta cells. *Cell Metab.* 10 (2009) 13–26.
- [104] E.R. Kandel, The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* 294 (2001) 1030–1038.
- [105] M. Costa-Mattioli, D. Gobert, H. Harding, B. Herdy, M. Azzi, M. Bruno, M. Bidinosti, C. Ben Mamou, E. Marcinkiewicz, M. Yoshida, H. Imataka, A.C. Cuellar, N. Seidah, W. Sossin, J.C. Lacaille, D. Ron, K. Nader, N. Sonenberg, Translational control of hippocampal synaptic plasticity and memory by the eIF2alpha kinase GCN2. *Nature* 436 (2005) 1166–1173.
- [106] M. Costa-Mattioli, D. Gobert, E. Stern, K. Gamache, R. Colina, C. Cuellar, W. Sossin, R. Kaufman, J. Pelletier, K. Rosenblum, K. Krnjevic, J.C. Lacaille, K. Nader, N. Sonenberg, eIF2alpha phosphorylation bidirectionally regulates the switch from short- to long-term synaptic plasticity and memory. *Cell* 129 (2007) 195–206.
- [107] A.L. Mellor, D.H. Munn, IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat. Rev. Immunol.* 4 (2004) 762–774.
- [108] A.L. Mellor, D.H. Munn, Creating immune privilege: active local suppression that benefits friends, but protects foes. *Nat. Rev. Immunol.* 8 (2008) 74–80.
- [109] P. Pierre, Immunity and the regulation of protein synthesis: surprising connections. *Curr. Opin. Immunol.* 21 (2009) 70–77.
- [110] J.R. Moffett, M.A. Namboodiri, Tryptophan and the immune response. *Immunol. Cell. Biol.* 81 (2003) 247–265.
- [111] A.M. Wolf, D. Wolf, H. Rumpold, A.R. Moschen, A. Kaser, P. Obrist, D. Fuchs, G. Brandacher, C. Winkler, K. Geboes, P. Rutgeerts, H. Tilg, Overexpression of indoleamine 2,3-dioxygenase in human inflammatory bowel disease. *Clin. Immunol.* 113 (2004) 47–55.
- [112] D.H. Munn, M. Zhou, J.T. Attwood, I. Bondarev, S.J. Conway, B. Marshall, C. Brown, A.L. Mellor, Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 281 (1998) 1191–1193.
- [113] M. Friberg, R. Jennings, M. Alsarraj, S. Dessureault, A. Cantor, M. Extermann, A.L. Mellor, D.H. Munn, S.J. Antonia, Indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to tumor cell evasion of T cell-mediated rejection. *Int. J. Cancer* 101 (2002) 151–155.
- [114] C. Uytendhoeve, L. Pilotte, I. Theate, V. Stroobant, D. Colau, N. Parmentier, T. Boon, B.J. Van den Eynde, Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nature Med.* 9 (2003) 1269–1274.
- [115] M.S. Sundrud, S.B. Koralov, M. Feuerer, D.P. Calado, A.E. Kozhaya, A. Rhule-Smith, R.E. Lefebvre, D. Unutmaz, R. Mazitschek, H. Waldner, M. Whitman, T. Keller, A. Rao, Halofuginone inhibits TH17 cell differentiation by activating the amino acid starvation response. *Science* 324 (2009) 1334–1338.

## **Amino acids as regulators of gene expression in mammals: molecular mechanisms.**

Bruhat A, Chérasse Y, **Chaveroux C**, Maurin AC, Jousse C, Fafournoux P.

Biofactors. 2009 May-Jun;35(3):249-57.

# Amino acids as regulators of gene expression in mammals: Molecular mechanisms

Alain Bruhat,<sup>1\*</sup> Yoan Chérasse,<sup>2</sup> Cédric Chaveroux,<sup>1</sup> Anne-Catherine Maurin,<sup>1</sup> Céline Jousse,<sup>1</sup> Pierre Fafournoux<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Ph.D., UMR 1019, Unité de Nutrition Humaine, INRA de Theix, 63122 Saint Genès Champanelle, France

<sup>2</sup>Osaka Bioscience Institute, 6-2-4 Furuedai, Suita-shi, Osaka 565-0874, Japan

## Abstract.

In mammals, the impact of nutrients on gene expression has become an important area of research. Because amino acids have multiple and important functions, their homeostasis has to be finely maintained. However, amino acidemia can be affected in some nutritional conditions and by various forms of stress. Consequently, mammals have to adjust physiological functions involved in the adaptation to amino

acid availability. Part of this regulation involves the modulation of numerous gene expression. It has been shown that amino acids by themselves can modify the expression of target genes. This review focuses on the recent advances in the understanding of the mechanisms involved in the control of mammalian gene expression in response to amino acid limitation.

© 2009 International Union of Biochemistry and Molecular Biology, Inc.  
Volume 35, Number 3, May/June 2009, Pages 249–257 •  
E-mail: bruhat@clermont.inra.fr

**Keywords:** amino acid, nutrient starvation, C/EBP homologous protein, asparagine synthetase, GCN2, ATF4, ATF2, JDP2

## 1. Introduction

The regulation of gene expression in response to changes in the nutritional environment is one of the most well documented events in prokaryotes and lower eukaryotes. These single-cell organisms are able to adjust their metabolic capacity in response to variations in the nutrient supply of the culture medium. For example, the nutrient-dependent regulation of the lactose, histidine, and tryptophan operons by their respective substrates has been well characterized in bacteria [1]. A limitation in the supply of these substrates will activate the expression of genes coding for enzymes

involved in their biosynthesis. Thus, these mechanisms involve the conditional regulation of specific genes in the presence or absence of appropriate nutrients.

In multicellular organisms, the control of gene expression differs in many aspects from that operating in single-cell organisms, and involves complex interactions between hormonal, neuronal, and nutritional factors. In mammals, nutrients are provided in a discontinuous way. To regulate their metabolism according to such variability in quantity and quality of nutrient availability, cells regulate their enzymatic equipment. They do so in part by regulating the expression of numerous genes. It has been shown that major (amino acids, carbohydrates, fatty acids, and sterols) and minor (minerals, vitamins) dietary constituents participate in the regulation of gene expression. In the last decade, significant progress has been achieved in the understanding of molecular mechanisms involved in the control of mammalian gene expression in response to amino acid limitation.

## 2. Physiological concepts underlying the regulation of gene expression by amino acids

Mammals have to precisely regulate amino acid homeostasis taking into account two important characteristics of amino acid metabolism: 1) multicellular organisms are unable to synthesize all amino acids and 2) there are no important dispensable amino acid stores.

Abbreviations: AP1, activating protein 1; ARE, AU-rich element; AARE, amino acid response element; APC, anterior piriform cortex; ASNS, asparagine synthetase; ATF, activating transcription factor; b-ZIP, basic leucine zipper; CAT-1, cationic amino acid transporter-1; C/EBP, CCAAT/enhancer binding protein; ChIP, chromatin immunoprecipitation; CHOP, C/EBP homologous protein; eIF2 $\alpha$ , eukaryotic initiation factor-2 $\alpha$ ; ER, endoplasmic reticulum; GCN2, general control nonderepressible protein 2; GH, growth hormone; HAT, histone acetyl transferase; HDAC, histone DeAcetylase; HRI, heme-regulated eIF2 $\alpha$  kinase; IGF1, insulin like growth factor 1; IGF2, insulin like growth factor 2; IGFBP1, insulin like growth factor binding protein1; IRES, internal ribosome entry site; JDP2, jun dimerization protein 2; KO, knock out; miRNA, microRNA; NSRE-1, nutrient sensing response element 1; NSRE-2, nutrient sensing response element 2; NSRU, nutrient sensing regulatory unit; PCAF, P300/CBP-associated factor; PERK, PKR-like ER kinase; PKR, protein kinase regulated by double stranded RNA; uORF, upstream open reading frame; UTR, UnTranslated region.

\*Address for correspondence: Alain Bruhat, Ph.D., UMR 1019, Unité de Nutrition Humaine, INRA de Theix, 63122 Saint Genès Champanelle, France. Tel.: +33 473 624 150; Fax: +334 73 62 47 55; E-mail: bruhat@clermont.inra.fr; or Pierre Fafournoux, UMR 1019, Unité de Nutrition Humaine, INRA de Theix, 63122 Saint Genès Champanelle, France. Tel.: +33 473 624 562; Fax: +334 73 62 47 55; E-mail: fpierre@clermont.inra.fr.

Received 3 February 2009; accepted 26 February 2009

DOI: 10.1002/biof.40

Published online 4 May 2009 in Wiley InterScience  
(www.interscience.wiley.com)

The size of each amino acid pool is the result of the balance between inputs and removals. The metabolic outlets for amino acids are protein synthesis and amino acid degradation, whereas the inputs are *de novo* synthesis (for nonessential amino acids), protein breakdown and dietary intake. Changes in the rates of these systems lead to an adjustment in nitrogen balance. Physiological or pathological conditions such as protein under-nutrition, imbalanced diet, and various forms of stress (trauma, sepsis, etc.) result in two major consequences: a large variation in the blood amino acid concentration and a negative nitrogen balance. In such situations, individuals have to adjust several physiological functions involved in the defense and adaptation to amino acid limitation by regulating numerous genes. Several examples in which amino acid homeostasis is altered will be detailed below.

### 2.1. Protein under-nutrition

Prolonged feeding on a low protein diet causes a fall in the plasma level of most essential amino acids. For example, in the plasma of children affected by kwashiorkor, leucine and methionine concentrations can be reduced from about 100–150 and 18–30  $\mu\text{M}$  to about 20  $\mu\text{M}$  and 5  $\mu\text{M}$ , respectively [2]. Consequently, individuals have to adjust several physiological functions in order to adapt to this amino acid deficiency. In both children and young animals, the main consequence of feeding a low protein diet is a dramatic inhibition of growth. Straus et al. [3] demonstrated that growth inhibition was due to a striking overexpression of IGFBP-1, which binds the growth factors IGF1 and IGF2 and modulates their mitogenic and metabolic properties. According to the literature [4], IGFBP-1 expression is regulated by GH, insulin, or glucose. However, the high IGFBP-1 levels associated with feeding a protein deficient diet cannot be explained by only these three factors. It has been demonstrated that IGFBP-1 induction resulted directly from a drop in amino acid concentration [3,5]. Therefore, amino acid limitation by itself, as dietary protein deficiency, participates in the down-regulation of body growth through the induction of IGFBP-1 expression.

### 2.2. Imbalanced diet

Indispensable amino acids needed for protein synthesis must be provided by the diet simultaneously. Any system allowing a rapid detection of a deficient or imbalanced diet should provide an adaptive advantage towards appropriate diet selection [6]. There seems to be at least three phases in the behavioral response of rats submitted to an imbalanced amino acid diet: 1) Animals must first recognize the dietary challenge. Before the behavioral effects occur, a decline in the concentration of the limiting essential amino acid is sensed in a specific brain area, the anterior pyriform cortex. This recognition phase is associated with localized decreases in the concentrations of the limiting amino acid and with altered protein synthesis. 2) Subsequent to recognition of the deficiency, a conditioned taste aversion develops, in order to minimize any deleterious effect of a long term feed-

ing with an imbalance diet. 3) Finally, in the absence of a choice, the animals adapt to an imbalanced diet (but not a diet totally devoid of one or more essential amino acids) in  $\sim 1$  week [7].

### 2.3. Pathological situations

In addition to nutritional factors, various forms of stress (trauma, thermal burn, sepsis, fever...) can affect amino acidemia and result in a negative nitrogen balance and a significant loss of body mass [8–12]. Depending on the catabolic insult and its severity, the loss in muscle protein results from decreased, normal, or even increased protein synthesis, which in the latter case, remains insufficient to compensate for higher proteolysis. This accelerated protein breakdown is associated with an inhibited uptake of amino acids by the muscles, leading to an increased flux of amino acids from the periphery to the liver. In parallel, hepatic uptake of amino acids is stimulated and protein synthesis and gluconeogenesis in the liver are enhanced [13]. Thus, high variations of amino acid concentrations can be observed in the body.

These examples demonstrate that variations in blood amino acid concentrations can activate in target cells, several control processes that can regulate the expression of specific target genes. The role of amino acids as regulators of gene expression is understood in only a few nutritional situations. By contrast, important progress has been made during the last 10 years in the understanding of the mechanisms by which amino acid limitation controls the expression of several specific target genes.

## 3. Molecular mechanisms involved in the regulation of gene expression by amino acid limitation

In mammalian cells, a number of genes induced following amino acid deprivation have been reported [14,15]. However, very few of them have been studied at the molecular level. Three distinct mechanisms of amino acid regulation of gene expression have been identified so far: (i) a transcriptional control: most of the information we have concerning the regulation of gene transcription by amino acid availability has been obtained studying *CHOP* and *Asparagine synthetase* (*ASNS*) genes; (ii) a stabilization of mRNA under starved conditions has also been shown for *CHOP* and *ASNS* but most of the results have been obtained for the arginine/lysine transporter CAT-1 and the activating transcription factor 3 (ATF3) mRNAs; (iii) a regulation of the translation rate of the CAT-1 mRNA by amino acid availability has also been reported.

### 3.1. Stabilization of the mRNA following amino acid starvation

Control of mRNA stability represents a critical regulatory mechanism of gene expression in mammalian cells that is

not well understood. It is becoming evident that specific trans-acting factors bind to AU-rich elements (AREs) in the 3'-untranslated regions (3'-UTRs) of a given mRNA and thereby mediate control of mRNA degradation or stabilization. Among the RNA-binding proteins identified so far, the ubiquitously expressed HuR protein has been associated with post-transcriptional stabilization of mRNA [16]. In addition to stabilization of ARE-containing mRNA molecules, HuR also plays a role in the nuclear export of mRNA and its control of translation.

Yaman et al. [17] demonstrated by RNA gel shift experiments that HuR could bind to an ARE within the 3'UTR sequence of *CAT-1*. They were also the first to report that amino acid limitation causes increased HuR accumulation in the cytoplasm. Consistent with that observation, cytoplasmic HuR binding to the *CAT-1* ARE was increased in response to amino acid starvation, resulting in stabilization of the mRNA. Like *CAT-1*, the 3' region of the *ATF3* mRNA contains several ARE sequences. Immunoprecipitation of HuR-RNA complexes followed by real time-PCR analysis showed that HuR also interacts with *ATF3* mRNA *in vivo* and that this interaction increases following amino acid starvation [18]. The increase in cytoplasmic accumulation of HuR paralleled the kinetics of *ATF3* mRNA accumulation. Furthermore, suppression of HuR protein content using RNAi partially blocked the increase in *ATF3* mRNA in response to amino acid starvation.

Taken together these results demonstrate that an adaptive response of mammalian cells to amino acid starvation involves an increased mRNA stability of *CAT-1* and *ATF3* mediated by HuR binding to one or more ARE.

### 3.2. Translational control of mRNA in response to amino acid starvation

It was also shown that the translation rate of specific genes could be regulated by amino acid availability. Indeed, amino acid limitation induces translation of pre-existing mRNA of two members of the CREB/ATF transcription factor family: *ATF4* and *ATF5* [19,20]. The 5'-UTR of these mRNA contains upstream open reading frames (uORFs) that are conserved among species and regulate translation.

Another example of amino acid-regulated translation has been demonstrated for the *CAT-1* mRNA. Besides a stabilization of the *CAT-1* mRNA, Hatzoglou and coworkers have demonstrated that amino acid depletion initiates molecular events that specifically activate translation of the *CAT-1* gene [21]. They have shown the presence of an Internal Ribosome Entry Site (IRES) located within the 5'UTR of the *CAT-1* mRNA which allows initiation independently of the 5'-cap. This IRES is involved in the amino acid-dependent translational control of the *CAT-1* transcript. Under conditions of amino acid starvation, translation from this IRES is stimulated, whereas the cap-dependent protein synthesis is decreased. Translation of a small upstream open reading frame (uORF) in the 5' end of the *CAT-1* mRNA is necessary for this amino acid-dependent translational control [22]. This translation leads to a change in mRNA structure that allows

ribosome entry at the IRES, and consequently, selective translation of the *CAT-1* coding sequence [23].

The regulation of gene expression by amino acids at a translational level can also involve microRNAs (miRNAs). miRNAs have been generally identified as negative regulators of the expression of cellular mRNAs. Filipowicz and coworkers provided evidence that the *CAT-1* mRNA can be relieved from miR-122-mediated repression in human hepatoma cells when they are subjected to different types of stress including amino acid starvation [24]. The derepression of *CAT-1* mRNA is accompanied by its release from cytoplasmic processing bodies and its recruitment to polysomes for translation. This process involves binding of HuR to the 3' UTR of *CAT-1* mRNA (see above).

### 3.3. Transcriptional activation of mammalian gene by amino acid starvation

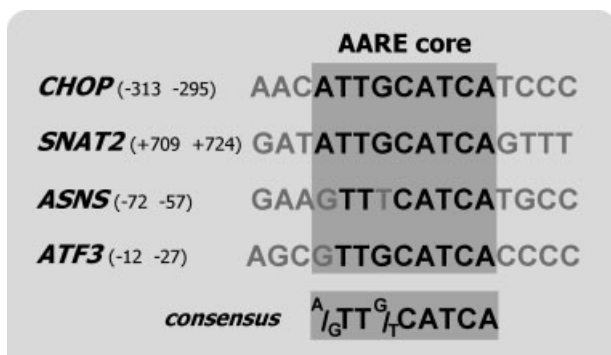
It was established that the increase in *CHOP* or *ASNS* mRNA following amino acid starvation is mainly due to an increased transcription in human cell lines [25,26]. By first identifying the genomic cis-elements and then the corresponding transcription factors responsible for the regulation of these specific target genes, it was anticipated that one can progress backwards up the signal transduction pathway to understand the individual steps required.

**3.3.1. *CHOP* regulation in response to amino acid starvation.** *CHOP* is a nuclear protein related to the CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) family of transcription factors that dimerizes with other members of its family [27]. *CHOP* gene expression is strongly induced by cellular stress such as ER stress, oxidative stress, DNA damage [28,29] but also by amino acid starvation both at transcriptional and post-transcriptional levels [26].

The amino acid regulation of *CHOP* transcription involves a cis-acting element located between -313 and -295 in the promoter that has been named Amino Acid Response Element (AARE) [30]. This element is essential for the induction of *CHOP* transcription by amino acid starvation and functions as an enhancer element. Its sequence (5'-ATTGCATCA-3') is related to the specific binding sites of two transcription factor families: C/EBP and ATF/CREB. Functional sequences that share a high nucleotide sequence similarity with *CHOP* AARE have also been identified in other amino acid-regulated genes such as *ASNS* [31], *ATF3* [32], and system A amino acid transporter (*SNAT2*) [33] (Fig. 1). They all share a 9 bp core element (5'-<sup>A</sup>/<sub>6</sub>TT<sup>G</sup>/<sub>1</sub>CATCA-3') but the sequences can differ by one or two nucleotides between genes.

It is now established that in amino acid-starved cells, a multiprotein complex is bound to the *CHOP* AARE sequences including a number of regulatory proteins such as *ATF4* [32,34,35], *ATF2* [32,36], and Jun Dimerization Protein 2 (*JDP2*) [37]. These factors are involved in either inducing or repressing transcription of target genes in response to amino acid starvation. Importantly, all of the known AARE





**Fig. 1. Sequence comparison of the *CHOP* AARE (–313 to –295) with the *ASNS* NSRE-1 (–57 to –72), the *SNAT2* AARE (+709 to +724) and the *ATF3* AARE (–12 to –27). Identical nucleotides are colored in black. The position of the minimum AARE core sequence is boxed in grey. The resulting minimum consensus sequence is shown at the bottom.**

sites bind ATF4 whereas the binding activity and the role of other AARE binding factors appear to vary according to the AARE sequence and chromatin structure. For example, *CHOP* and *ATF3* sequences also bind ATF2, whereas the *ASNS* site does not [30,32,38].

**3.3.1.1. ATF4.** ATF4 belongs to the basic region/leucine zipper (bZIP) family of transcription factors that also includes members of the Jun/Fos (AP-1) family [39,40]. Its key role in amino acid regulated transcription has been clearly established in the past few years [32,35,41,42]. In the case of *CHOP*, it has been shown that (i) the expression of ATF4 and its binding to *CHOP* AARE sequences are increased following amino acid starvation, (ii) in cells devoid of ATF4 expression, the induction of *CHOP* upon amino acid starvation is completely lost, (iii) when over-expressed, ATF4 by itself is able to activate the *CHOP* AARE-dependent transcription, and (iv) even though ATF4 is necessary for the induction of *CHOP* expression in response to leucine starvation, it is not sufficient. In a recent study, Cherasse et al. [43] have identified p300/CBP-associated factor (PCAF) as a novel interaction partner of ATF4. PCAF is a coactivator of ATF4 and is involved in the enhancement of *CHOP* transcription following amino acid starvation.

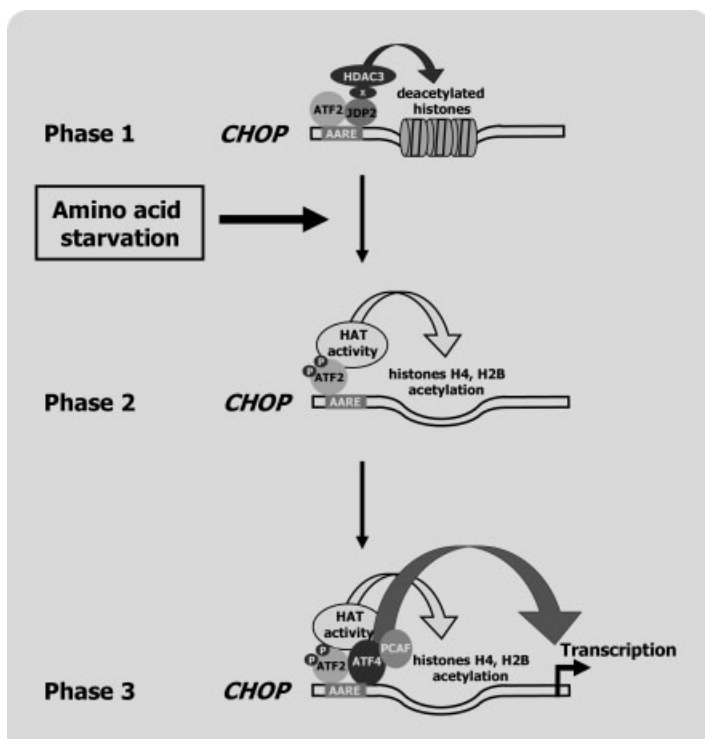
**3.3.1.2. ATF2.** ATF2 belongs to the bZIP family of transcription factors and is an important member of activating protein 1 (AP-1) [44]. The transactivation capacity of the N-terminal domain of this transcription factor can be enhanced through phosphorylation of two N-terminal threonine residues Thr-69 and Thr-71 [45–47]. In the context of *CHOP* regulation by amino acid starvation, the role of ATF2 has been studied [30,35,36]. It was shown that (i) in cells devoid of ATF2 expression, the induction of *CHOP* transcription upon amino acid starvation is completely lost, (ii) ATF2 binds to the *CHOP* AARE in both starved and unstarved conditions, (iii) ATF2 phosphorylation is necessary for the activation of the *CHOP* AARE-dependent transcription. In a further study, it has been reported using a chromatin immunoprecipitation

(ChIP) approach that *in vivo* binding of phospho-ATF2 and ATF4 to *CHOP* AARE are associated with acetylation of histones H4 and H2B in response to amino acid starvation [36]. A time course analysis revealed that ATF2 phosphorylation precedes histone acetylation, ATF4 binding, and the increase in *CHOP* mRNA. Using cells devoid of ATF2 expression, it has also been demonstrated that ATF2 is essential for the acetylation of histones H4 and H2B within AARE sequences in response to amino acid starvation. Phosphorylation of this transcription factor may have a key role in stimulating an unidentified histone acetyl transferase (HAT) activity. The role of ATF2 on histone H4 acetylation has been extended to *ATF3*, another amino acid regulated gene [36]. Thus, ATF2 appears to be involved in promoting the modification of the chromatin structure to enhance *CHOP* and *ATF3* transcription in response to amino acid starvation.

**3.3.1.3. JDP2.** Jun Dimerization Protein 2 (JDP2) is a bZIP protein that can interact with c-Jun and ATF2. It was reported to repress the ATF2-mediated transcription by recruiting histone deacetylase HDAC3 complex to the promoter of target genes [48]. In a recent study, Cherasse et al. [43] showed that JDP2 binds to the *CHOP* AARE in non-starved condition and that its binding decreases following amino acid starvation acting as a repressor of *CHOP* transcription. Jin et al. [49] provided evidence that JDP2 regulates gene expression via direct control of the modification of histones and the assembly of chromatin. In fed cells, the ability of the AARE-bound JDP2 to recruit HDAC3 could contribute to the silencing of *CHOP* transcription via the maintenance of the hypoacetylation status of histones. However, the mechanism by which amino acid starvation leads to a decrease in JDP2 binding merits further investigation.

Taken together, these results demonstrate that following amino acid starvation there is a highly coordinated time-dependent program of interaction between a precise set of bZIP transcription factors and the AARE, leading to the transcriptional activation of *CHOP* (Fig. 2).

**3.3.2. Asparagine synthetase (*ASNS*) regulation by amino acid starvation.** *ASNS* is ubiquitously expressed in most mammalian cells and is responsible for the biosynthesis of asparagine from aspartate and glutamine [50]. As *CHOP*, transcription of the *ASNS* gene is increased in response to amino acid or glucose starvation. Guerrini et al. [50] have been the first to show that a region located from –70 to –62 in the promoter of *ASNS* is responsible for its regulation in response to amino acid starvation. Later on, Barbosa-Tessmann et al. [51,52] demonstrated that this sequence is also responsible for the induction of *ASNS* by glucose starvation, that is, following Endoplasmic Reticulum (ER) stress. This sequence was then referred to as the Nutrient-Sensing Response Element-1 (NSRE-1) [52]. Further promoter analysis indicated that a second sequence, 11 nucleotides downstream from NSRE-1, is also required for activation by both amino acid starvation and ER stress. This sequence is referred to as NSRE-2. This genomic unit (NSRE-1 + NSRE-2) has been named NSRU standing for Nutrient-Sensing



**Fig. 2. Working model for control of the *CHOP* gene following amino acid starvation.** Based on the current knowledge, we propose a working model to depict in a relatively simple form those proteins thought to play a role in regulating *CHOP* transcription following amino acid limitation. In fed cells (Phase 1), the ability of AARE-bound JDP2 to recruit HDAC3 could contribute to the silencing of *CHOP* transcription via the maintenance of the hypoacetylation status of histones. During Phase 2, 0–1 h after amino acid concentration decline, phosphorylation of ATF2 at the *CHOP* AARE occurs on two N-terminal threonine residues Thr-69 and Thr-71. The phosphorylation of this transcription factor may have a key role in stimulating an unidentified histone acetyl transferase (HAT) activity leading to acetylation of histones H4 and H2B. During Phase 3, 30 min to 4 h after amino acid decline, ATF4 binding to the *CHOP* AARE increases as a result of an increased abundance of nuclear ATF4 protein. This rapid increase in ATF4 protein and binding occurs because of the translational control of existing ATF4 mRNA and takes place within 45 min to 1 h of amino acid removal. The presence of AARE-bound ATF4 leads to the recruitment of the coactivator PCAF. The binding of these factors leads to the transcription initiation of *CHOP* and the increase in mRNA. Therefore, following amino acid starvation there is a highly coordinated time-dependent program of interaction between a precise set of bZIP transcription factors and the AARE leading to transcriptional activation of *CHOP*.

Response Unit. Using a ChIP approach, Kilberg and coworkers [41] demonstrated that amino acid deprivation increased ATF3, ATF4, and C/EBP $\beta$  binding to the *ASNS* NSRE-1 and enhanced promoter association of RNA polymerase II, TATA-binding protein, and TFIIB of the general transcription machinery. A time course analysis revealed a markedly different temporal order of interaction between these transcription factors and the *ASNS* promoter.

*CHOP* AARE and *ASNS* NSRU share some common features: NSRE-1 site binds *in vitro* ATF4 and C/EBP $\beta$  [34,53], showing thus the same specificity as the AARE sequence in the *CHOP* promoter. The core sequences of the *CHOP* AARE and the *ASNS* NSRE-1 differ only by two nucleotides (Fig. 1). However, some differences prompt us to think that *CHOP* and *ASNS* induction following amino acid starvation does not entirely occur through a unique and common mechanism: (i) the region just downstream of *CHOP* AARE does not show sequence homology with the NSRE-2 site, (ii) Siu et al. [53] showed that ATF2 does not bind, *in vitro*, to the *ASNS* NSRE-1 (iii) the amino acid specificity in relation to the degree of induction of these two genes is different [54]. Hence, *CHOP* AARE and *ASNS* NSRE-1 are structurally related but functionally distinct.

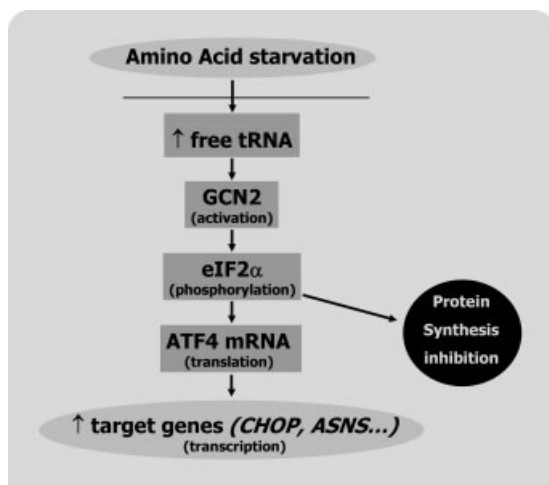
All these data suggest that although most of the amino acid responsive genes have AARE sites that are similar in sequence, the key regulator ATF4 and other distinct transcription factors and coactivators may be involved in modulating transcriptional activation. These differences in mechanism would permit flexibility among amino acid-regulated genes in the rapidity and magnitude of the transcriptional response for the same initial signal. Further insight into how the transcriptional machinery assembles at the amino acid responsive gene promoter and modulates transcription will improve our understanding of the molecular steps required for nutritional control by the amino acid response pathway.

### 3.4. Amino acid signaling pathways

In mammals, the signaling pathways that mediate the amino acid response are not completely identified. Only a pathway involved in the regulation of gene expression in response to amino acid starvation has been well described at the molecular level: the GCN2/ATF4 pathway. However, comparison of the regulatory mechanisms involved in the control of gene expression by amino acid availability between yeast and mammals suggests that other control processes could be involved in mammalian cells.

#### 3.4.1. The GCN2/ATF4 signaling pathway.

**3.4.1.1. In yeast.** One of the pathways involved in amino acid regulation of gene expression is the so-called “general control process” during which the general control nonderepressible protein 2 (GCN2) kinase activity is induced in response to amino acid starvation. Indeed, free tRNAs accumulating during amino acid starvation are able to activate GCN2, which in turn phosphorylates the  $\alpha$  subunit of translation initiation factor eIF2 (eIF2 $\alpha$ ). This impairs the



**Fig. 3. The mammalian GCN2/ATF4 signaling pathway.** Mammals have evolved complex adaptive mechanisms that enable cells to survive many stressful environmental conditions including amino acid limitation. The signal transduction pathway that is triggered in response to amino acid starvation is referred to as the amino acid response (AAR). The initial step in the AAR is the activation by uncharged tRNAs of GCN2 kinase which phosphorylates the  $\alpha$  subunit of translation initiation factor eIF2 (eIF2 $\alpha$ ) on serine 51. This phosphorylation decreases protein synthesis by inhibiting the delivery of the initiator Met-tRNA<sub>i</sub> to the initiation complex. However, eIF2 $\alpha$  phosphorylation also triggers the translation of specific mRNAs including ATF4. Once induced, ATF4 directly or indirectly induces transcription of specific target genes such as *CHOP*, *ASNS*, or *ATF3*. In mammals, three other eIF2 $\alpha$  kinases leading to ATF4 expression have been identified: PKR (activated by double-stranded RNA during viral infection), HRI (activated by heme deficiency), and PERK (activated by protein load in the endoplasmic reticulum).

synthesis of the 43S preinitiation complex and thus strongly inhibits translation initiation. Under these circumstances, the transcription factor GCN4 is translationally up-regulated due to the presence of upstream open reading frames (uORFs) in its 5'UTR. As a result, GCN4 induces the expression of more than 30 genes involved in several biosynthetic pathways [55–57].

**3.4.1.2. In mammals.** Limiting the extracellular supply of an essential amino acid or blocking the synthesis of an otherwise nonessential one results in the activation of a signal transduction pathway that is referred to as the Amino Acid Response (AAR) [42]. As described in yeast, the initial step in the AAR is the activation by uncharged tRNA of the mammalian GCN2 homologue which phosphorylates eIF2 $\alpha$  on serine 51 (Fig. 3) [58,59]. This phosphorylation decreases the translation of most mRNAs. However, eIF2 $\alpha$  phosphorylation also triggers the translation of specific mRNAs including a “master regulator” ATF4 by a similar mechanism than GCN4

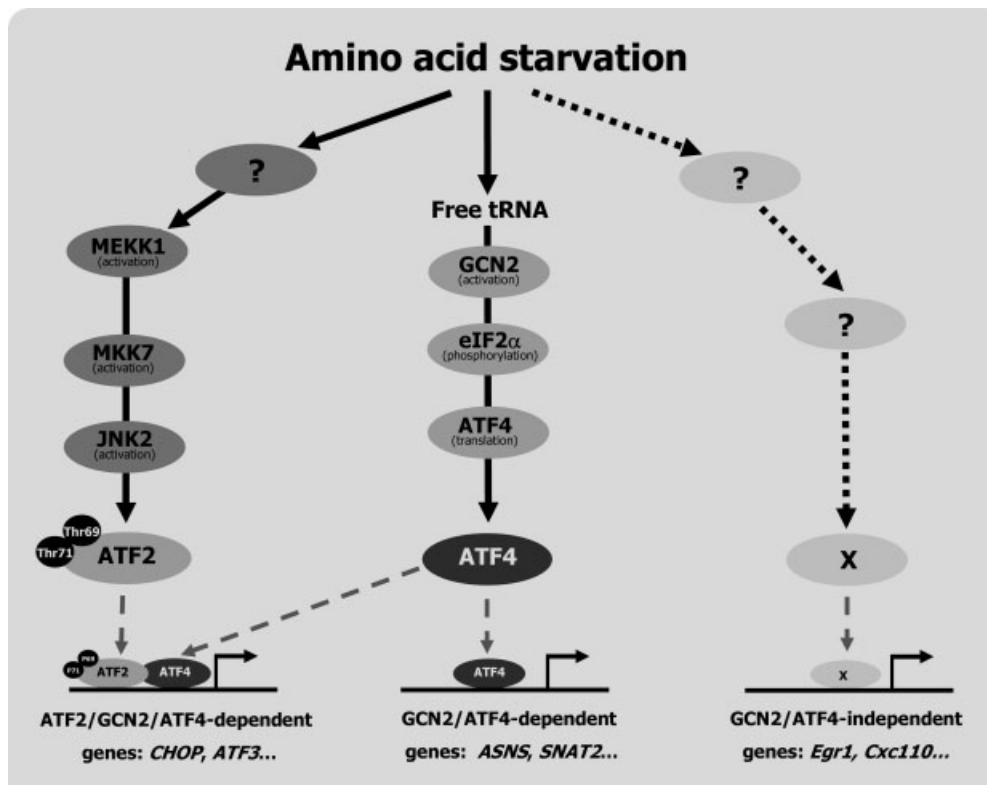
in yeast. Vatterm and Wek [19] have shown that the ATF4 mRNA contains two uORFs which contribute differentially to ATF4 translation. uORF1 is a positive-acting element that facilitates translation of the ATF4-coding region in response to stress-induced eIF2 phosphorylation. By contrast uORF2 is inhibitory, blocking ATF4 expression in nonstressed cells. Once induced, ATF4 directly or indirectly induces transcription of specific target genes such as *ASNS* and *CHOP* [60].

**3.4.1.3. Tissue specificity of the GCN2/ATF4 signaling pathway.** It is now clear that in mammals the cellular background plays a crucial role in amino acid-regulated gene expression. Indeed, the regulation of the expression of one gene by amino acid limitation depends on: (i) the amino acid concentration in the vicinity of the cell, (ii) the ability of the cell to respond to the amino starvation (enzymatic equipment...). In addition, the amino acid concentration [61] and GCN2 expression [62] can be very variable between different localization in a given tissue. Recently, the comparison between myoblasts and myotubes revealed that the GCN2 pathway is poorly activated by amino acid starvation in myotubes [63]. It has been suggested that a low expression of GCN2 associated with amino-acid supply from intracellular proteolysis could contribute to the nonactivation of the GCN2/ATF4 pathway by amino acid starvation in myotubes. An important challenge for future work would be to understand the mechanisms involved in GCN2 activation/inactivation according to the cell type.

**3.4.1.4. Physiological role of GCN2 in response to amino acid starvation.** Two recent studies revealed a physiological role for GCN2 [64,65]. The authors reported that GCN2 participates in nutritional stress management that guides food selection for survival. To insure an adequate supply of nutrients, omnivores choose among available food sources. This process is exemplified by the well-characterized innate aversion of omnivores to otherwise nutritious foods of imbalanced amino acid content. Inactivation of GCN2 impairs this aversive response. Moreover, using a conditional KO model for this kinase, Maurin et al. [65] showed that the brain plays an important role in this process. Thus, GCN2 activation represents an obligatory step of the food intake inhibition by amino-acid imbalance and brain appears to be the main sensing site. In addition to regulating amino acid metabolism, a novel function of GCN2 has been recently found in regulating lipid homeostasis during amino acid starvation [66].

**3.4.2. Amino acid signaling pathway leading to ATF2 phosphorylation.** The data presented above establish that phosphorylation of ATF2 plays a key role in stimulating transcription of specific genes in response to amino acid starvation. It has also been described that amino acid starvation induces ATF2 phosphorylation on Thr-69 and Thr-71 in human cell lines [35]. Collectively, these data demonstrate the existence of a specific amino acid-regulated pathway leading to the phosphorylation of ATF2. Recently, this pathway including the c-Jun N-terminal kinase 2 (JNK2) has been partially identified (Chaveroux et al., manuscript submitted).





**Fig. 4.** Amino acid signaling pathways involved in the control of gene transcription in mammals. In mammals, the signaling pathways that mediate the amino acid response are not completely identified. The GCN2/ATF4 pathway involved in the regulation of gene expression in response to amino acid starvation has been well described at the molecular level. An amino acid signaling pathway leading to the phosphorylation of ATF2 occurs on Thr-69 and Thr-71 has been partially identified. In this pathway, amino acid starvation transactivates MEKK1, which is, in turn, responsible for activation of mitogen-activated protein kinase kinase 7 (MKK7). MKK7 regulates JNK2 activation, which, in turn, triggers the phosphorylation of ATF2. The amino acid sensor upstream this pathway remains to be identified. Recently, it has been demonstrated that, in addition to the GCN2/ATF4 pathway, other pathways could be involved in the up-regulation of gene transcription in response to amino acid limitation. The molecular mechanisms involved in these pathways remain unknown. Therefore, we propose that amino acid-regulated genes can be divided into three classes according to their GCN2- and ATF2-dependence in mammalian cells: (i) The first class is composed of genes which are GCN2/ATF4-dependent but not ATF2-dependent such as *ASNS* and *SNAT2*; (ii) GCN2- and ATF2-dependent genes such as *CHOP* and *ATF3* constitute the second class (iii) in the third class of genes the lack of GCN2 does not affect the amino acid regulation (*Egr1* and *Cxcl10*).

Amino acid starvation transactivates MEKK1, which is, in turn, responsible for activation of mitogen-activated protein kinase kinase 7 (MKK7). MKK7 regulates JNK2 activation, which, in turn, triggers the phosphorylation of ATF2 (Fig. 4). However, the amino acid sensor upstream of this MEKK1/MKK7/JNK2 signaling pathway remains to be identified.

*Cxcl10*...) and at post-transcriptional level (*Dusp16*...) by amino acid starvation have been identified. However, the signaling pathways and the transcriptional or post-transcriptional mechanisms remain to be investigated (Fig. 4).

## 4. Conclusion

**3.4.3. GCN2 independent signaling pathways.** In mammals, the signaling pathways that mediate the amino acid response are not yet completely understood. Using transcription profiling from cells devoid of GCN2 expression, Deval et al. [15] recently demonstrated that, in addition to the GCN2/ATF4 pathway, other signaling mechanisms could be involved in the up- and down-regulation of gene expression in response to amino acid limitation. Series of GCN2-independent genes regulated at transcriptional level (*Egr1*,

The idea that amino acids can regulate gene expression is now well established. However, further work will be necessary to understand the molecular steps by which the cellular concentration of an individual amino acid can regulate gene expression. The molecular basis of gene regulation by dietary protein intake is an important field of research for studying the regulation of the physiological functions of individuals living under conditions of restricted, imbalanced, or excessive food intake.

## Acknowledgements

The authors wish to thank Valérie Carraro and Laurent Parry for the helpful discussion and technical assistance.

## References

- [1] Miller, J. H. and Reznikoff, W. S. (1978) *The operon*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- [2] Grimble, R. F. and Whitehead, R. G. (1970) Fasting serum-aminoacid patterns in kwashiorkor and after administration of different levels of protein. *Lancet* **1**, 918–920.
- [3] Straus, D. S., Burke, E. J., and Marten, N. W. (1993) Induction of insulin-like growth factor binding protein-1 gene expression in liver of protein-restricted rats and in rat hepatoma cells limited for a single amino acid. *Endocrinology* **132**, 1090–1100.
- [4] Lee, P. D., Conover, C. A., and Powell, D. R. (1993) Regulation and function of insulin-like growth factor-binding protein-1. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **204**, 4–29.
- [5] Jousse, C., Bruhat, A., Ferrara, M., and Fafournoux, P. (1998) Physiological concentration of amino acids regulates insulin-like growth-factor-binding protein 1 expression. *Biochem. J.* **334**, 147–153.
- [6] Gietzen, D. W. (1993) Neural mechanisms in the responses to amino acid deficiency. *J. Nutr.* **123**, 610–625.
- [7] Gietzen, D. W. and Magrum, L. J. (2001) Molecular mechanisms in the brain involved in the anorexia of branched-chain amino acid deficiency. *J. Nutr.* **131**, 851S–855S.
- [8] Jeejeebhoy, K. N. (1981) Protein nutrition in clinical practice. *Br. Med. Bull.* **37**, 11–17.
- [9] Cynober, L. (1989) Amino acid metabolism in thermal burns. *JPEN. J. Parenter. Enteral. Nutr.* **13**, 196–205.
- [10] Wolfe, R. R., Jahoor, F., and Hartl, W. H. (1989) Protein and amino acid metabolism after injury. *Diabetes Metab. Rev.* **5**, 149–164.
- [11] Ziegler, T. R., Gatzert, C., and Wilmore, D. W. (1994) Strategies for attenuating protein-catabolic responses in the critically ill. *Annu. Rev. Med.* **45**, 459–480.
- [12] Biolo, G., Toigo, G., Ciochi, B., Situlin, R., Iscra, F., Gullo, A., and Guarneri, G. (1997) Metabolic response to injury and sepsis: changes in protein metabolism. *Nutrition* **13**, 52S–57S.
- [13] Hasselgren, P. O., Pedersen, P., Sax, H. C., Warner, B. W., and Fischer, J. E. (1988) Current concepts of protein turnover and amino acid transport in liver and skeletal muscle during sepsis. *Arch. Surg.* **123**, 992–999.
- [14] Straus, D. S. (1994) Nutritional regulation of hormones and growth factors that control mammalian growth. *FASEB J.* **8**, 6–12.
- [15] Deval, C., Chaveroux, C., Maurin, A. C., Cherasse, Y., Parry, L., Carraro, V., Milenkovic, D., Ferrara, M., Bruhat, A., Jousse, C., and Fafournoux, P. (2009) Amino acid limitation regulates the expression of genes involved in several specific biological processes through GCN2-dependent and GCN2-independent pathways. *FEBS J.* **276**, 707–718.
- [16] Brennan, C. M. and Steitz, J. A. (2001) HuR and mRNA stability. *Cell Mol. Life. Sci.* **58**, 266–277.
- [17] Yaman, I., Fernandez, J., Sarkar, B., Schneider, R. J., Snider, M. D., Nagy, L. E., and Hatzoglou, M. (2002) Nutritional control of mRNA stability is mediated by a conserved AU-rich element that binds the cytoplasmic shuttling protein HuR. *J. Biol. Chem.* **277**, 41539–41546.
- [18] Pan, Y. X., Chen, H., and Kilberg, M. S. (2005) Interaction of RNA-binding proteins HuR and AUF1 with the human ATF3 mRNA 3'-untranslated region regulates its amino acid limitation-induced stabilization. *J. Biol. Chem.* **280**, 34609–34616.
- [19] Vattam, K. M. and Wek, R. C. (2004) Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 11269–11274.
- [20] Watatani, Y., Ichikawa, K., Nakanishi, N., Fujimoto, M., Takeda, H., Kimura, N., Hirose, H., Takahashi, S., and Takahashi, Y. (2008) Stress-induced translation of ATF5 mRNA is regulated by the 5'-untranslated region. *J. Biol. Chem.* **283**, 2543–2553.
- [21] Fernandez, J., Yaman, I., Sarnow, P., Snider, M. D., and Hatzoglou, M. (2002) Regulation of internal ribosomal entry site-mediated translation by phosphorylation of the translation initiation factor eIF2alpha. *J. Biol. Chem.* **277**, 19198–19205.
- [22] Fernandez, J., Yaman, I., Merrick, W. C., Koromilas, A., Wek, R. C., Sood, R., Hensold, J., and Hatzoglou, M. (2002) Regulation of internal ribosome entry site-mediated translation by eukaryotic initiation factor-2alpha phosphorylation and translation of a small upstream open reading frame. *J. Biol. Chem.* **277**, 2050–2058.
- [23] Yaman, I., Fernandez, J., Liu, H., Caprara, M., Komar, A. A., Koromilas, A. E., Zhou, L., Snider, M. D., Scheuner, D., Kaufman, R. J., and Hatzoglou, M. (2003) The zipper model of translational control: a small upstream ORF is the switch that controls structural remodeling of an mRNA leader. *Cell* **113**, 519–531.
- [24] Bhattacharyya, S. N., Habermacher, R., Martine, U., Closs, E. I., and Filipowicz, W. (2006) Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell* **125**, 1111–1124.
- [25] Hutson, R. G. and Kilberg, M. S. (1994) Cloning of rat asparagine synthetase and specificity of the amino acid-dependent control of its mRNA content. *Biochem. J.* **304**, 745–750.
- [26] Bruhat, A., Jousse, C., Wang, X. Z., Ron, D., Ferrara, M., and Fafournoux, P. (1997) Amino acid limitation induces expression of CHOP, a CCAAT/enhancer binding protein-related gene, at both transcriptional and post-transcriptional levels. *J. Biol. Chem.* **272**, 17588–17593.
- [27] Ron, D. and Habener, J. F. (1992) CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes Dev.* **6**, 439–453.
- [28] Sylvester, S. L., ap Rhys, C. M., Luethy-Martindale, J. D., and Holbrook, N. J. (1994) Induction of GADD153, a CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)-related gene, during the acute phase response in rats. Evidence for the involvement of C/EBPs in regulating its expression [published erratum appears in J Biol Chem 1995 Jun 16;270(24):14842]. *J. Biol. Chem.* **269**, 20119–20125.
- [29] Luethy, J. D. and Holbrook, N. J. (1992) Activation of the gadd153 promoter by genotoxic agents: a rapid and specific response to DNA damage. *Cancer Res.* **52**, 5–10.
- [30] Bruhat, A., Jousse, C., Carraro, V., Reimold, A. M., Ferrara, M., and Fafournoux, P. (2000) Amino acids control mammalian gene transcription: activating transcription factor 2 is essential for the amino acid responsiveness of the CHOP promoter. *Mol. Cell Biol.* **20**, 7192–7204.
- [31] Zhong, C., Chen, C., and Kilberg, M. S. (2003) Characterization of the nutrient-sensing response unit in the human asparagine synthetase promoter. *Biochem. J.* **372**, 603–609.
- [32] Pan, Y. X., Chen, H., Thiaville, M. M., and Kilberg, M. S. (2007) Activation of the ATF3 gene through a co-ordinated amino acid-sensing response programme that controls transcriptional regulation of responsive genes following amino acid limitation. *Biochem. J.* **401**, 299–307.
- [33] Palii, S. S., Chen, H., and Kilberg, M. S. (2004) Transcriptional control of the human sodium-coupled neutral amino acid transporter system A gene by amino acid availability is mediated by an intronic element. *J. Biol. Chem.* **279**, 3463–3471.
- [34] Siu, F., Bain, P. J., LeBlanc-Chaffin, R., Chen, H., and Kilberg, M. S. (2002) ATF4 is a mediator of the nutrient-sensing response pathway that activates the human asparagine synthetase gene. *J. Biol. Chem.* **277**, 24120–24127.
- [35] Averous, J., Bruhat, A., Jousse, C., Carraro, V., Thiel, G., and Fafournoux, P. (2004) Induction of CHOP expression by amino acid limitation requires both ATF4 expression and ATF2 phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **279**, 5288–5297.
- [36] Bruhat, A., Cherasse, Y., Maurin, A. C., Breitwieser, W., Parry, L., Deval, C., Jones, N., Jousse, C., and Fafournoux, P. (2007) ATF2 is required for amino acid-regulated transcription by orchestrating specific histone acetylation. *Nucleic Acids Res.* **35**, 1312–1321.
- [37] Cherasse, Y., Chaveroux, C., Jousse, C., Maurin, A. C., Carraro, V., Parry, L., Fafournoux, P., and Bruhat, A. (2008) Role of the repressor JDP2 in the amino acid-regulated transcription of CHOP. *FEBS Lett.* **582**, 1537–1541.
- [38] Bruhat, A., Averous, J., Carraro, V., Zhong, C., Reimold, A. M., Kilberg, M. S., and Fafournoux, P. (2002) Differences in the molecular mechanisms involved in the transcriptional activation of the CHOP and asparagine synthetase genes in response to amino acid deprivation or

- activation of the unfolded protein response. *J. Biol. Chem.* **277**, 48107–48114.
- [39] Karpinski, B. A., Morle, G. D., Huggenvik, J., Uhler, M. D., and Leiden, J. M. (1992) Molecular cloning of human CREB-2: an ATF/CREB transcription factor that can negatively regulate transcription from the cAMP response element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 4820–4824.
- [40] Ameri, K. and Harris, A. L. (2008) Activating transcription factor 4. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**, 14–21.
- [41] Chen, H., Pan, Y. X., Dudenhausen, E. E., and Kilberg, M. S. (2004) Amino acid deprivation induces the transcription rate of the human asparagine synthetase gene through a timed program of expression and promoter binding of nutrient-responsive basic region/leucine zipper transcription factors as well as localized histone acetylation. *J. Biol. Chem.* **279**, 50829–50839.
- [42] Kilberg, M. S., Pan, Y. X., Chen, H., and Leung-Pineda, V. (2005) Nutritional control of gene expression: How Mammalian Cells Respond to Amino Acid Limitation\*. *Annu. Rev. Nutr.* **25**, 59–85.
- [43] Cherasse, Y., Maurin, A. C., Chaveroux, C., Jousse, C., Carraro, V., Parry, L., Deval, C., Chambon, C., Fafournoux, P., and Bruhat, A. (2007) The p300/CBP-associated factor (PCAF) is a cofactor of ATF4 for amino acid-regulated transcription of CHOP. *Nucleic Acids Res.* **35**, 5954–5965.
- [44] Wagner, E. F. (2001) AP-1-Introductory remarks. *Oncogene* **20**, 2334–2335.
- [45] Gupta, S., Campbell, D., Derijard, B., and Davis, R. J. (1995) Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science* **267**, 389–393.
- [46] Livingstone, C., Patel, G., and Jones, N. (1995) ATF-2 contains a phosphorylation-dependent transcriptional activation domain. *EMBO J.* **14**, 1785–1797.
- [47] Ouwens, D. M., de Ruiter, N. D., van der Zon, G. C., Carter, A. P., Schouten, J., van der Burgt, C., Kooistra, K., Bos, J. L., Maassen, J. A., and van Dam, H. (2002) Growth factors can activate ATF2 via a two-step mechanism: phosphorylation of Thr71 through the Ras-MEK-ERK pathway and of Thr69 through RalGDS-Src-p38. *EMBO J.* **21**, 3782–3793.
- [48] Jin, C., Li, H., Murata, T., Sun, K., Horikoshi, M., Chiu, R., and Yokoyama, K. K. (2002) JDP2, a repressor of AP-1, recruits a histone deacetylase 3 complex to inhibit the retinoic acid-induced differentiation of F9 cells. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 4815–4826.
- [49] Jin, C., Kato, K., Chimura, T., Yamasaki, T., Nakade, K., Murata, T., Li, H., Pan, J., Zhao, M., Sun, K., Chiu, R., Ito, T., Nagata, K., Horikoshi, M., and Yokoyama, K. K. (2006) Regulation of histone acetylation and nucleosome assembly by transcription factor JDP2. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 331–338.
- [50] Andrulis, I. L., Chen, J., and Ray, P. N. (1987) Isolation of human cDNAs for asparagine synthetase and expression in Jensen rat sarcoma cells. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 2435–2443.
- [51] Barbosa-Tessmann, I. P., Chen, C., Zhong, C., Schuster, S. M., Nick, H. S., and Kilberg, M. S. (1999) Activation of the unfolded protein response pathway induces human asparagine synthetase gene expression. *J. Biol. Chem.* **274**, 31139–31144.
- [52] Barbosa-Tessmann, I. P., Chen, C., Zhong, C., Siu, F., Schuster, S. M., Nick, H. S., and Kilberg, M. S. (2000) Activation of the human asparagine synthetase gene by the amino acid response and the endoplasmic reticulum stress response pathways occurs by common genomic elements. *J. Biol. Chem.* **275**, 26976–26985.
- [53] Siu, F., Chen, C., Zhong, C., and Kilberg, M. S. (2001) CCAAT/Enhancer-binding protein-beta is a mediator of the nutrient-sensing response pathway that activates the human asparagine synthetase gene. *J. Biol. Chem.* **276**, 48100–48107.
- [54] Jousse, C., Bruhat, A., Ferrara, M., and Fafournoux, P. (2000) Evidence for multiple signaling pathways in the regulation of gene expression by amino acids in human cell lines. *J. Nutr.* **130**, 1555–1560.
- [55] Dever, T. E., Feng, L., Wek, R. C., Cigan, A. M., Donahue, T. F., and Hinnebusch, A. G. (1992) Phosphorylation of initiation factor 2 alpha by protein kinase GCN2 mediates gene-specific translational control of GCN4 in yeast. *Cell* **68**, 585–596.
- [56] Hinnebusch, A. G. (1994) The eIF-2 alpha kinases: regulators of protein synthesis in starvation and stress. *Semin. Cell Biol.* **5**, 417–426.
- [57] Hinnebusch, A. G. (1997) Translational regulation of yeast GCN4. A window on factors that control initiator-tRNA binding to the ribosome. *J. Biol. Chem.* **272**, 21661–21664.
- [58] Kimball, S. R. and Jefferson, L. S. (2004) Amino acids as regulators of gene expression. *Nutr. Metab. (Lond)*, **1**(1), 3.
- [59] Wek, R. C., Jiang, H. Y., and Anthony, T. G. (2006) Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem. Soc. Trans.* **34**, 7–11.
- [60] Harding, H. P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P. D., Calton, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B., Paules, R., Stojdl, D. F., Bell, J. C., Hettmann, T., Leiden, J. M., and Ron, D. (2003) An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol. Cell* **11**, 619–633.
- [61] Koehnle, T. J., Russell, M. C., Morin, A. S., Erecius, L. F., and Gietzen, D. W. (2004) Diets deficient in indispensable amino acids rapidly decrease the concentration of the limiting amino acid in the anterior piriform cortex of rats. *J. Nutr.* **134**, 2365–2371.
- [62] Costa-Mattioli, M., Gobert, D., Harding, H., Herdy, B., Azzi, M., Bruno, M., Bidinosti, M., Ben Mamou, C., Marcinkiewicz, E., Yoshida, M., Imataka, H., Cuello, A. C., Seidah, N., Sossin, W., Lacaille, J. C., Ron, D., Nader, K., and Sonenberg, N. (2005) Translational control of hippocampal synaptic plasticity and memory by the eIF2alpha kinase GCN2. *Nature* **436**, 1166–1173.
- [63] Deval, C., Talvas, J., Chaveroux, C., Maurin, A. C., Mordier, S., Cherasse, Y., Parry, L., Carraro, V., Jousse, C., Bruhat, A., and Fafournoux, P. (2008) Amino-acid limitation induces the GCN2 signaling pathway in myoblasts but not in myotubes. *Biochimie* **90**, 1716–1721.
- [64] Hao, S., Sharp, J. W., Ross-Inta, C. M., McDaniel, B. J., Anthony, T. G., Wek, R. C., Cavener, D. R., McGrath, B. C., Rudell, J. B., Koehnle, T. J., and Gietzen, D. W. (2005) Uncharged tRNA and sensing of amino acid deficiency in mammalian piriform cortex. *Science* **307**, 1776–1778.
- [65] Maurin, A. C., Jousse, C., Averous, J., Parry, L., Bruhat, A., Cherasse, Y., Zeng, H., Zhang, Y., Harding, H. P., Ron, D., and Fafournoux, P. (2005) The GCN2 kinase biases feeding behavior to maintain amino acid homeostasis in omnivores. *Cell Metab.* **1**, 273–277.
- [66] Guo, F. and Cavener, D. R. (2007) The GCN2 eIF2alpha kinase regulates fatty-acid homeostasis in the liver during deprivation of an essential amino acid. *Cell Metab.* **5**, 103–114.

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abastado JP, Miller PF, Hinnebusch AG (1991) A quantitative model for translational control of the GCN4 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *New Biol* **3**: 511-524

Abdel-Sater F, El Bakkoury M, Urrestarazu A, Vissers S, Andre B (2004) Amino acid signaling in yeast: casein kinase I and the Ssy5 endoprotease are key determinants of endoproteolytic activation of the membrane-bound Stp1 transcription factor. *Molecular and cellular biology* **24**: 9771-9785

Abe MK, Kahle KT, Saelzler MP, Orth K, Dixon JE, Rosner MR (2001) ERK7 is an autoactivated member of the MAPK family. *The Journal of biological chemistry* **276**: 21272-21279

Abe MK, Kuo WL, Hershenson MB, Rosner MR (1999) Extracellular signal-regulated kinase 7 (ERK7), a novel ERK with a C-terminal domain that regulates its activity, its cellular localization, and cell growth. *Molecular and cellular biology* **19**: 1301-1312

Abe MK, Saelzler MP, Espinosa R, 3rd, Kahle KT, Hershenson MB, Le Beau MM, Rosner MR (2002) ERK8, a new member of the mitogen-activated protein kinase family. *The Journal of biological chemistry* **277**: 16733-16743

Adler V, Franklin CC, Kraft AS (1992) Phorbol esters stimulate the phosphorylation of c-Jun but not v-Jun: regulation by the N-terminal delta domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 5341-5345

Ahn NG, Weiel JE, Chan CP, Krebs EG (1990) Identification of multiple epidermal growth factor-stimulated protein serine/threonine kinases from Swiss 3T3 cells. *The Journal of biological chemistry* **265**: 11487-11494

Alessi DR, Pearce LR, Garcia-Martinez JM (2009) New insights into mTOR signaling: mTORC2 and beyond. *Science signaling* **2**: pe27

Ameri K, Harris AL (2008) Activating transcription factor 4. *The international journal of biochemistry & cell biology* **40**: 14-21

Andreasson C, Ljungdahl PO (2002) Receptor-mediated endoproteolytic activation of two transcription factors in yeast. *Genes & development* **16**: 3158-3172

Andrulis IL, Chen J, Ray PN (1987) Isolation of human cDNAs for asparagine synthetase and expression in Jensen rat sarcoma cells. *Molecular and cellular biology* **7**: 2435-2443.

Andrulis IL, Shotwell M, Evans-Blackler S, Zalkin H, Siminovitch L, Ray PN (1989) Fine structure analysis of the Chinese hamster AS gene encoding asparagine synthetase. *Gene* **80**: 75-85

Aoki TT, Brennan MF, Muller WA, Soeldner JS, Alpert JS, Saltz SB, Kaufmann RL, Tan MH, Cahill GF, Jr. (1976) Amino acid levels across normal forearm muscle and splanchnic bed after a protein meal. *The American journal of clinical nutrition* **29**: 340-350

Aouadi M, Binetruy B, Caron L, Le Marchand-Brustel Y, Bost F (2006) Role of MAPKs in development and differentiation: lessons from knockout mice. *Biochimie* **88**: 1091-1098

Aplin AE, Howe A, Alahari SK, Juliano RL (1998) Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev* **50**: 197-263

Appleton J (2002) Arginine: Clinical potential of a semi-essential amino. *Altern Med Rev* **7**: 512-522

Asthaigiri AR, Nelson CM, Horwitz AF, Lauffenburger DA (1999) Quantitative relationship among integrin-ligand binding, adhesion, and signaling via focal adhesion kinase and extracellular signal-regulated kinase 2. *The Journal of biological chemistry* **274**: 27119-27127

Aubel C, Dehez S, Chabanon H, Seva C, Ferrara M, Brachet P (2001) Activation of c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK-1) after amino acid deficiency in HeLa cells. *Cellular signalling* **13**: 417-423

Aulak KS, Mishra R, Zhou L, Hyatt SL, de Jonge W, Lamers W, Snider M, Hatzoglou M (1999) Post-transcriptional regulation of the arginine transporter Cat-1 by amino acid availability. *The Journal of biological chemistry* **274**: 30424-30432.

Averous J, Bruhat A, Jousse C, Carraro V, Thiel G, Fafournoux P (2004) Induction of CHOP expression by amino acid limitation requires both ATF4 expression and ATF2 phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* **279**: 5288-5297

Avruch J (1998) Insulin signal transduction through protein kinase cascades. *Mol Cell Biochem* **182**: 31-48

Baertl JM, Placko RP, Graham GG (1974) Serum proteins and plasma free amino acids in severe malnutrition. *The American journal of clinical nutrition* **27**: 733-742

Bailey J, Europe-Finner GN (2005) Identification of human myometrial target genes of the c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) pathway: the role of activating transcription factor 2 (ATF2) and a novel spliced isoform ATF2-small. *Journal of molecular endocrinology* **34**: 19-35

Bailey J, Phillips RJ, Pollard AJ, Gilmore K, Robson SC, Europe-Finner GN (2002) Characterization and functional analysis of cAMP response element modulator protein and activating transcription factor 2 (ATF2) isoforms in the human myometrium during pregnancy and labor: identification of a novel ATF2 species with potent transactivation properties. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **87**: 1717-1728

Balvay L, Lopez Lastra M, Sargueil B, Darlix JL, Ohlmann T (2007) Translational control of retroviruses. *Nat Rev Microbiol* **5**: 128-140

Barbet NC, Schneider U, Helliwell SB, Stansfield I, Tuite MF, Hall MN (1996) TOR controls translation initiation and early G1 progression in yeast. *Molecular biology of the cell* **7**: 25-42

Barbosa-Tessmann IP, Chen C, Zhong C, Siu F, Schuster SM, Nick HS, Kilberg MS (2000) Activation of the human asparagine synthetase gene by the amino acid response and the endoplasmic reticulum stress response pathways occurs by common genomic elements. *The Journal of biological chemistry* **275**: 26976-26985.

Barbosa-Tessmann IP, Pineda VL, Nick HS, Schuster SM, Kilberg MS (1999) Transcriptional regulation of the human asparagine synthetase gene by carbohydrate availability. *The Biochemical journal* **339**: 151-158

Barr AJ, Knapp S (2006) MAPK-specific tyrosine phosphatases: new targets for drug discovery? *Trends in pharmacological sciences* **27**: 525-530

Beardmore VA, Hinton HJ, Eftychi C, Apostolaki M, Armaka M, Darragh J, McIlrath J, Carr JM, Armit LJ, Clacher C, Malone L, Kollias G, Arthur JS (2005) Generation and characterization of p38beta (MAPK11) gene-targeted mice. *Molecular and cellular biology* **25**: 10454-10464

Beevers CS, Chen L, Liu L, Luo Y, Webster NJ, Huang S (2009) Curcumin disrupts the Mammalian target of rapamycin-raptor complex. *Cancer research* **69**: 1000-1008

Ben-Levy R, Hooper S, Wilson R, Paterson HF, Marshall CJ (1998) Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2. *Curr Biol* **8**: 1049-1057

Bernard F, Andre B (2001) Genetic analysis of the signalling pathway activated by external amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **41**: 489-502

Bhattacharyya R, Banerjee J, Khalili K, Wedegaertner PB (2009) Differences in Galpha12- and Galpha13-mediated plasma membrane recruitment of p115-RhoGEF. *Cellular signalling* **21**: 996-1006

Bhattacharyya SN, Habermacher R, Martine U, Closs EI, Filipowicz W (2006) Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell* **125**: 1111-1124

Bhoulmik A, Lopez-Bergami P, Ronai Z (2007) ATF2 on the double - activating transcription factor and DNA damage response protein. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society* **20**: 498-506

Bhoulmik A, Singha N, O'Connell MJ, Ronai ZA (2008) Regulation of TIP60 by ATF2 modulates ATM activation. *The Journal of biological chemistry* **283**: 17605-17614

Bhoulmik A, Takahashi S, Breitweiser W, Shiloh Y, Jones N, Ronai Z (2005) ATM-dependent phosphorylation of ATF2 is required for the DNA damage response. *Molecular cell* **18**: 577-587



- Biolo G, Toigo G, Ciocchi B, Situlin R, Iscra F, Gullo A, Guarnieri G (1997) Metabolic response to injury and sepsis: changes in protein metabolism. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif)* **13**: 52S-57S.
- Biondi RM, Nebreda AR (2003) Signalling specificity of Ser/Thr protein kinases through docking-site-mediated interactions. *The Biochemical journal* **372**: 1-13
- Block KP, Harper AE (1991) High levels of dietary amino and branched-chain alpha-keto acids alter plasma and brain amino acid concentrations in rats. *The Journal of nutrition* **121**: 663-671
- Bogoyevitch MA, Boehm I, Oakley A, Ketterman AJ, Barr RK (2004) Targeting the JNK MAPK cascade for inhibition: basic science and therapeutic potential. *Biochimica et biophysica acta* **1697**: 89-101
- Bohe J, Low A, Wolfe RR, Rennie MJ (2003) Human muscle protein synthesis is modulated by extracellular, not intramuscular amino acid availability: a dose-response study. *The Journal of physiology* **552**: 315-324
- Borsheim E, Bui QU, Tissier S, Kobayashi H, Ferrando AA, Wolfe RR (2008) Effect of amino acid supplementation on muscle mass, strength and physical function in elderly. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)* **27**: 189-195
- Bost F, Aouadi M, Caron L, Even P, Belmonte N, Prot M, Dani C, Hofman P, Pages G, Pouyssegur J, Le Marchand-Brustel Y, Binetruy B (2005) The extracellular signal-regulated kinase isoform ERK1 is specifically required for in vitro and in vivo adipogenesis. *Diabetes* **54**: 402-411
- Boulton TG, Gregory JS, Cobb MH (1991a) Purification and properties of extracellular signal-regulated kinase 1, an insulin-stimulated microtubule-associated protein 2 kinase. *Biochemistry* **30**: 278-286
- Boulton TG, Gregory JS, Jong SM, Wang LH, Ellis L, Cobb MH (1990) Evidence for insulin-dependent activation of S6 and microtubule-associated protein-2 kinases via a human insulin receptor/v-ros hybrid. *The Journal of biological chemistry* **265**: 2713-2719
- Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, DePinho RA, Panayotatos N, Cobb MH, Yancopoulos GD (1991b) ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* **65**: 663-675
- Bradbury EM, Inglis RJ, Matthews HR, Sarner N (1973) Phosphorylation of very-lysine-rich histone in *Physarum polycephalum*. Correlation with chromosome condensation. *European journal of biochemistry / FEBS* **33**: 131-139
- Breitwieser W, Lyons S, Flenniken AM, Ashton G, Bruder G, Willington M, Lacaud G, Kouskoff V, Jones N (2007) Feedback regulation of p38 activity via ATF2 is essential for survival of embryonic liver cells. *Genes & development* **21**: 2069-2082
- Brennan CM, Steitz JA (2001) HuR and mRNA stability. *Cell Mol Life Sci* **58**: 266-277



Brewster JL, de Valoir T, Dwyer ND, Winter E, Gustin MC (1993) An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science (New York, NY)* **259**: 1760-1763

Brondello JM, Brunet A, Pouyssegur J, McKenzie FR (1997) The dual specificity mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and -2 are induced by the p42/p44MAPK cascade. *The Journal of biological chemistry* **272**: 1368-1376

Brott BK, Pinsky BA, Erikson RL (1998) Nlk is a murine protein kinase related to Erk/MAP kinases and localized in the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 963-968

Bruhat A, Cherasse Y, Chaveroux C, Maurin AC, Jousse C, Fafournoux P (2009) Amino acids as regulators of gene expression in mammals: Molecular mechanisms. *BioFactors (Oxford, England)*

Bruhat A, Cherasse Y, Maurin AC, Breitwieser W, Parry L, Deval C, Jones N, Jousse C, Fafournoux P (2007) ATF2 is required for amino acid-regulated transcription by orchestrating specific histone acetylation. *Nucleic acids research* **35**: 1312-1321

Bruhat A, Jousse C, Carraro V, Reimold AM, Ferrara M, Fafournoux P (2000) Amino acids control mammalian gene transcription: activating transcription factor 2 is essential for the amino acid responsiveness of the CHOP promoter. *Molecular and cellular biology* **20**: 7192-7204.

Buchsbaum RJ, Connolly BA, Feig LA (2002) Interaction of Rac exchange factors Tiam1 and Ras-GRF1 with a scaffold for the p38 mitogen-activated protein kinase cascade. *Molecular and cellular biology* **22**: 4073-4085

Byun JY, Yoon CH, An S, Park IC, Kang CM, Kim MJ, Lee SJ (2009) The Rac1/MKK7/JNK pathway signals upregulation of Atg5 and subsequent autophagic cell death in response to oncogenic Ras. *Carcinogenesis*

Camps M, Nichols A, Arkinstall S (2000) Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function. *Faseb J* **14**: 6-16

Cano N. BD, Schneider S., Vasson M.P., Hasselman M., Leverve X. (2007) *Traité de nutrition artificielle de l'adulte*, 3eme edition edn.: Springer.

Cardenas ME, Cutler NS, Lorenz MC, Di Como CJ, Heitman J (1999) The TOR signaling cascade regulates gene expression in response to nutrients. *Genes & development* **13**: 3271-3279

Castellano F, Montcourrier P, Guillemot JC, Gouin E, Machesky L, Cossart P, Chavrier P (1999) Inducible recruitment of Cdc42 or WASP to a cell-surface receptor triggers actin polymerization and filopodium formation. *Curr Biol* **9**: 351-360

Chang J, Nicolas E, Marks D, Sander C, Lerro A, Buendia MA, Xu C, Mason WS, Moloshok T, Bort R, Zaret KS, Taylor JM (2004) miR-122, a mammalian liver-specific microRNA, is

processed from hcr mRNA and may downregulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1. *RNA biology* **1**: 106-113

Chang YY, Juhasz G, Goraksha-Hicks P, Arsham AM, Mallin DR, Muller LK, Neufeld TP (2009) Nutrient-dependent regulation of autophagy through the target of rapamycin pathway. *Biochemical Society transactions* **37**: 232-236

Chao TH, Hayashi M, Tapping RI, Kato Y, Lee JD (1999) MEKK3 directly regulates MEK5 activity as part of the big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) signaling pathway. *The Journal of biological chemistry* **274**: 36035-36038

Chaveroux C, Jousse C, Cherasse Y, Maurin AC, Parry L, Carraro V, Derijard B, Bruhat A, Fafournoux P (2009) Identification of a novel amino acid response pathway triggering ATF2 phosphorylation in mammals. *Molecular and cellular biology*

Chen BP, Wolfgang CD, Hai T (1996) Analysis of ATF3, a transcription factor induced by physiological stresses and modulated by gadd153/Chop10. *Molecular and cellular biology* **16**: 1157-1168

Chen F, Ma L, Parrini MC, Mao X, Lopez M, Wu C, Marks PW, Davidson L, Kwiatkowski DJ, Kirchhausen T, Orkin SH, Rosen FS, Mayer BJ, Kirschner MW, Alt FW (2000) Cdc42 is required for PIP(2)-induced actin polymerization and early development but not for cell viability. *Curr Biol* **10**: 758-765

Chen JJ (2007) Regulation of protein synthesis by the heme-regulated eIF2alpha kinase: relevance to anemias. *Blood* **109**: 2693-2699

Chen YJ, Wang CJ, Yang KD, Chang PR, Huang HC, Huang YT, Sun YC, Wang FS (2003) Pertussis toxin-sensitive Galphai protein and ERK-dependent pathways mediate ultrasound promotion of osteogenic transcription in human osteoblasts. *FEBS letters* **554**: 154-158

Chen Z, Gibson TB, Robinson F, Silvestro L, Pearson G, Xu B, Wright A, Vanderbilt C, Cobb MH (2001) MAP kinases. *Chemical reviews* **101**: 2449-2476

Cheng M, Boulton TG, Cobb MH (1996) ERK3 is a constitutively nuclear protein kinase. *The Journal of biological chemistry* **271**: 8951-8958

Cherasse Y, Chaveroux C, Jousse C, Maurin AC, Carraro V, Parry L, Fafournoux P, Bruhat A (2008) Role of the repressor JDP2 in the amino acid-regulated transcription of CHOP. *FEBS letters* **582**: 1537-1541

Cherasse Y, Maurin AC, Chaveroux C, Jousse C, Carraro V, Parry L, Deval C, Chambon C, Fafournoux P, Bruhat A (2007) The p300/CBP-associated factor (PCAF) is a cofactor of ATF4 for amino acid-regulated transcription of CHOP. *Nucleic acids research* **35**: 5954-5965

Cherkasova VA, Hinnebusch AG (2003) Translational control by TOR and TAP42 through dephosphorylation of eIF2alpha kinase GCN2. *Genes & development* **17**: 859-872

Chiolero R, Revelly JP, Tappy L (1997) Energy metabolism in sepsis and injury. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif)* **13**: 45S-51S

Choi KW, Benzer S (1994) Rotation of photoreceptor clusters in the developing *Drosophila* eye requires the nemo gene. *Cell* **78**: 125-136

Chung S, Funakoshi T, Civelli O (2008) Orphan GPCR research. *British journal of pharmacology* **153 Suppl 1**: S339-346

Constant SL, Dong C, Yang DD, Wysk M, Davis RJ, Flavell RA (2000) JNK1 is required for T cell-mediated immunity against *Leishmania major* infection. *J Immunol* **165**: 2671-2676

Cooney DA, Handschumacher RE (1970) L-asparaginase and L-asparagine metabolism. *Annual review of pharmacology* **10**: 421-440

Coulombe P, Meloche S (2007) Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions. *Biochimica et biophysica acta* **1773**: 1376-1387

Courchesne WE, Kunisawa R, Thorner J (1989) A putative protein kinase overcomes pheromone-induced arrest of cell cycling in *S. cerevisiae*. *Cell* **58**: 1107-1119

Cuenda A, Cohen P, Buee-Scherrer V, Goedert M (1997) Activation of stress-activated protein kinase-3 (SAPK3) by cytokines and cellular stresses is mediated via SAPKK3 (MKK6); comparison of the specificities of SAPK3 and SAPK2 (RK/p38). *The EMBO journal* **16**: 295-305

Dalrymple MB, Pfleger KD, Eidne KA (2008) G protein-coupled receptor dimers: functional consequences, disease states and drug targets. *Pharmacology & therapeutics* **118**: 359-371

Danen EH, Yamada KM (2001) Fibronectin, integrins, and growth control. *J Cell Physiol* **189**: 1-13

Dard N, Peter M (2006) Scaffold proteins in MAP kinase signaling: more than simple passive activating platforms. *Bioessays* **28**: 146-156

Davis RJ (2000) Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* **103**: 239-252

De Angelis R, Iezzi S, Bruno T, Corbi N, Di Padova M, Floridi A, Fanciulli M, Passananti C (2003) Functional interaction of the subunit 3 of RNA polymerase II (RPB3) with transcription factor-4 (ATF4). *FEBS letters* **547**: 15-19

De Virgilio C, Loewith R (2006) Cell growth control: little eukaryotes make big contributions. *Oncogene* **25**: 6392-6415

Deak M, Clifton AD, Lucocq LM, Alessi DR (1998) Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *The EMBO journal* **17**: 4426-4441

Derijard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B, Deng T, Karin M, Davis RJ (1994) JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* **76**: 1025-1037

Derijard B, Raingeaud J, Barrett T, Wu IH, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ (1995) Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science (New York, NY)* **267**: 682-685

Deval C, Chaveroux C, Maurin AC, Cherasse Y, Parry L, Carraro V, Milenkovic D, Ferrara M, Bruhat A, Jousse C, Fafournoux P (2009) Amino acid limitation regulates the expression of genes involved in several specific biological processes through GCN2-dependent and GCN2-independent pathways. *The FEBS journal* **276**: 707-718

Dever TE, Feng L, Wek RC, Cigan AM, Donahue TF, Hinnebusch AG (1992) Phosphorylation of initiation factor 2 alpha by protein kinase GCN2 mediates gene-specific translational control of GCN4 in yeast. *Cell* **68**: 585-596

Dhanasekaran DN, Kashef K, Lee CM, Xu H, Reddy EP (2007) Scaffold proteins of MAP-kinase modules. *Oncogene* **26**: 3185-3202

Dhanasekaran DN, Reddy EP (2008) JNK signaling in apoptosis. *Oncogene* **27**: 6245-6251

Dickinson RJ, Keyse SM (2006) Diverse physiological functions for dual-specificity MAP kinase phosphatases. *Journal of cell science* **119**: 4607-4615

Dobkin-Bekman M, Naidich M, Pawson AJ, Millar RP, Seger R, Naor Z (2006) Activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) by GnRH is cell-context dependent. *Molecular and cellular endocrinology* **252**: 184-190

Ekerot M, Stavridis MP, Delavaine L, Mitchell MP, Staples C, Owens DM, Keenan ID, Dickinson RJ, Storey KG, Keyse SM (2008) Negative-feedback regulation of FGF signalling by DUSP6/MKP-3 is driven by ERK1/2 and mediated by Ets factor binding to a conserved site within the DUSP6/MKP-3 gene promoter. *The Biochemical journal* **412**: 287-298

Elion EA, Grisafi PL, Fink GR (1990) FUS3 encodes a cdc2+/CDC28-related kinase required for the transition from mitosis into conjugation. *Cell* **60**: 649-664

English JM, Pearson G, Baer R, Cobb MH (1998) Identification of substrates and regulators of the mitogen-activated protein kinase ERK5 using chimeric protein kinases. *The Journal of biological chemistry* **273**: 3854-3860

English JM, Vanderbilt CA, Xu S, Marcus S, Cobb MH (1995) Isolation of MEK5 and differential expression of alternatively spliced forms. *The Journal of biological chemistry* **270**: 28897-28902

Enslen H, Branchio DM, Davis RJ (2000) Molecular determinants that mediate selective activation of p38 MAP kinase isoforms. *The EMBO journal* **19**: 1301-1311

Enslen H, Raingeaud J, Davis RJ (1998) Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6. *The Journal of biological chemistry* **273**: 1741-1748

Erickson AK, Payne DM, Martino PA, Rossomando AJ, Shabanowitz J, Weber MJ, Hunt DF, Sturgill TW (1990) Identification by mass spectrometry of threonine 97 in bovine myelin

basic protein as a specific phosphorylation site for mitogen-activated protein kinase. *The Journal of biological chemistry* **265**: 19728-19735

Eswaran J, von Kries JP, Marsden B, Longman E, Debreczeni JE, Ugochukwu E, Turnbull A, Lee WH, Knapp S, Barr AJ (2006) Crystal structures and inhibitor identification for PTPN5, PTPRR and PTPN7: a family of human MAPK-specific protein tyrosine phosphatases. *The Biochemical journal* **395**: 483-491

Fafournoux P, Remesy C, Demigne C (1990) Fluxes and membrane transport of amino acids in rat liver under different protein diets. *Am J Physiol* **259**: E614-625

Farnham PJ (2009) Insights from genomic profiling of transcription factors. *Nat Rev Genet* **10**: 605-616

Farooq A, Zhou MM (2004) Structure and regulation of MAPK phosphatases. *Cellular signalling* **16**: 769-779

Fawcett TW, Martindale JL, Guyton KZ, Hai T, Holbrook NJ (1999) Complexes containing activating transcription factor (ATF)/cAMP- responsive-element-binding protein (CREB) interact with the CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)-ATF composite site to regulate Gadd153 expression during the stress response. *The Biochemical journal* **339**: 135-141

Feijoo C, Campbell DG, Jakes R, Goedert M, Cuenda A (2005) Evidence that phosphorylation of the microtubule-associated protein Tau by SAPK4/p38delta at Thr50 promotes microtubule assembly. *Journal of cell science* **118**: 397-408

Fernandez J, Lopez AB, Wang C, Mishra R, Zhou L, Yaman I, Snider MD, Hatzoglou M (2003) Transcriptional control of the arginine/lysine transporter, cat-1, by physiological stress. *The Journal of biological chemistry* **278**: 50000-50009

Fernandez J, Yaman I, Mishra R, Merrick WC, Snider MD, Lamers WH, Hatzoglou M (2001) Internal ribosome entry site-mediated translation of a mammalian mRNA is regulated by amino acid availability. *The Journal of biological chemistry* **276**: 12285-12291

Fernandez J, Yaman I, Sarnow P, Snider MD, Hatzoglou M (2002) Regulation of internal ribosomal entry site-mediated translation by phosphorylation of the translation initiation factor eIF2alpha. *The Journal of biological chemistry* **277**: 19198-19205.

Ferreira RR, Varisi VA, Meinhardt LW, Lea PJ, Azevedo RA (2005) Are high-lysine cereal crops still a challenge? *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]* **38**: 985-994

Fischer AM, Katayama CD, Pages G, Pouyssegur J, Hedrick SM (2005) The role of erk1 and erk2 in multiple stages of T cell development. *Immunity* **23**: 431-443

Foltz IN, Gerl RE, Wieler JS, Luckach M, Salmon RA, Schrader JW (1998) Human mitogen-activated protein kinase kinase 7 (MKK7) is a highly conserved c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) activated by environmental stresses and physiological stimuli. *The Journal of biological chemistry* **273**: 9344-9351

Forsberg H, Ljungdahl PO (2001) Sensors of extracellular nutrients in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current genetics* **40**: 91-109.

Franchi-Gazzola R, Visigalli R, Bussolati O, Dall'Asta V, Gazzola GC (1999) Adaptive increase of amino acid transport system A requires ERK1/2 activation. *The Journal of biological chemistry* **274**: 28922-28928

Frank SR, Adelstein MR, Hansen SH (2006) GIT2 represses Crk- and Rac1-regulated cell spreading and Cdc42-mediated focal adhesion turnover. *The EMBO journal* **25**: 1848-1859

Freshney NW, Rawlinson L, Guesdon F, Jones E, Cowley S, Hsuan J, Saklatvala J (1994) Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell* **78**: 1039-1049

Frye RA (1992) Involvement of G proteins, cytoplasmic calcium, phospholipases, phospholipid-derived second messengers, and protein kinases in signal transduction from mitogenic cell surface receptors. *Cancer Treat Res* **63**: 281-299

Ganiatsas S, Kwee L, Fujiwara Y, Perkins A, Ikeda T, Labow MA, Zon LI (1998) SEK1 deficiency reveals mitogen-activated protein kinase cascade crossregulation and leads to abnormal hepatogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 6881-6886

Garcia MA, Meurs EF, Esteban M (2007) The dsRNA protein kinase PKR: virus and cell control. *Biochimie* **89**: 799-811

Gazzola GC, Dall'Asta V, Guidotti GG (1981) Adaptive regulation of amino acid transport in cultured human fibroblasts. Sites and mechanism of action. *The Journal of biological chemistry* **256**: 3191-3198

Gentile S, Darden T, Erxleben C, Romeo C, Russo A, Martin N, Rossie S, Armstrong DL (2006) Rac GTPase signaling through the PP5 protein phosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 5202-5206

Georgopoulos K, Morgan BA, Moore DD (1992) Functionally distinct isoforms of the CRE-BP DNA-binding protein mediate activity of a T-cell-specific enhancer. *Molecular and cellular biology* **12**: 747-757

Gietzen DW (2000) *Amino acid recognition in the central nervous system*, Boca-Raton  
London  
New york  
Washington: CRC press.

Gingras AC, Raught B, Gygi SP, Niedzwiecka A, Miron M, Burley SK, Polakiewicz RD, Wyslouch-Cieszyńska A, Aebersold R, Sonenberg N (2001) Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. *Genes & development* **15**: 2852-2864.

Glogauer M, Marchal CC, Zhu F, Worku A, Clausen BE, Foerster I, Marks P, Downey GP, Dinanuer M, Kwiatkowski DJ (2003) Rac1 deletion in mouse neutrophils has selective effects on neutrophil functions. *J Immunol* **170**: 5652-5657

Goedert M, Cuenda A, Craxton M, Jakes R, Cohen P (1997a) Activation of the novel stress-activated protein kinase SAPK4 by cytokines and cellular stresses is mediated by SKK3 (MKK6); comparison of its substrate specificity with that of other SAP kinases. *The EMBO journal* **16**: 3563-3571

Goedert M, Hasegawa M, Jakes R, Lawler S, Cuenda A, Cohen P (1997b) Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by stress-activated protein kinases. *FEBS letters* **409**: 57-62

Golden T, Swingle M, Honkanen RE (2008) The role of serine/threonine protein phosphatase type 5 (PP5) in the regulation of stress-induced signaling networks and cancer. *Cancer metastasis reviews* **27**: 169-178

Goldsmith ZG, Dhanasekaran DN (2007) G protein regulation of MAPK networks. *Oncogene* **26**: 3122-3142

Gong SS, Guerrini L, Basilico C (1991) Regulation of asparagine synthetase gene expression by amino acid starvation. *Molecular and cellular biology* **11**: 6059-6066

Gonzalez FA, Raden DL, Rigby MR, Davis RJ (1992) Heterogeneous expression of four MAP kinase isoforms in human tissues. *FEBS letters* **304**: 170-178

Goodfellow IG, Roberts LO (2008) Eukaryotic initiation factor 4E. *The international journal of biochemistry & cell biology* **40**: 2675-2680

Grallert B, Boye E (2007) The Gcn2 kinase as a cell cycle regulator. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* **6**: 2768-2772

Greco A, Gong SS, Ittmann M, Basilico C (1989) Organization and expression of the cell cycle gene, ts11, that encodes asparagine synthetase. *Molecular and cellular biology* **9**: 2350-2359

Grewal S, Molina DM, Bardwell L (2006) Mitogen-activated protein kinase (MAPK)-docking sites in MAPK kinases function as tethers that are crucial for MAPK regulation in vivo. *Cellular signalling* **18**: 123-134

Griffiths RD, Hinds CJ, Little RA (1999) Manipulating the metabolic response to injury. *British medical bulletin* **55**: 181-195

Gronda M, Arab S, Iafrate B, Suzuki H, Zanke BW (2001) Hematopoietic protein tyrosine phosphatase suppresses extracellular stimulus-regulated kinase activation. *Molecular and cellular biology* **21**: 6851-6858

Groppo R, Richter JD (2009) Translational control from head to tail. *Current opinion in cell biology* **21**: 444-451

- Gu JL, Muller S, Mancino V, Offermanns S, Simon MI (2002) Interaction of G alpha(12) with G alpha(13) and G alpha(q) signaling pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 9352-9357
- Guan KL, Broyles SS, Dixon JE (1991) A Tyr/Ser protein phosphatase encoded by vaccinia virus. *Nature* **350**: 359-362
- Guhaniyogi J, Brewer G (2001) Regulation of mRNA stability in mammalian cells. *Gene* **265**: 11-23
- Guo F, Cavener DR (2007) The GCN2 eIF2alpha kinase regulates fatty-acid homeostasis in the liver during deprivation of an essential amino acid. *Cell Metab* **5**: 103-114
- Gupta S, Barrett T, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sluss HK, Derijard B, Davis RJ (1996) Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *The EMBO journal* **15**: 2760-2770
- Gupta S, Campbell D, Derijard B, Davis RJ (1995) Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science (New York, NY)* **267**: 389-393.
- Hai T, Hartman MG (2001) The molecular biology and nomenclature of the activating transcription factor/cAMP responsive element binding family of transcription factors: activating transcription factor proteins and homeostasis. *Gene* **273**: 1-11.
- Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ (1994) A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science (New York, NY)* **265**: 808-811
- Hara K, Yonezawa K, Weng QP, Kozlowski MT, Belham C, Avruch J (1998) Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. *The Journal of biological chemistry* **273**: 14484-14494.
- Harding HP, Novoa II, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, Ron D (2000) Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Molecular cell* **6**: 1099-1108.
- Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calton M, Sadri N, Yun C, Popko B, Paules R, Stojdl DF, Bell JC, Hettmann T, Leiden JM, Ron D (2003) An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Molecular cell* **11**: 619-633
- Hardwick JS, Kuruvilla FG, Tong JK, Shamji AF, Schreiber SL (1999) Rapamycin-modulated transcription defines the subset of nutrient-sensitive signaling pathways directly controlled by the Tor proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 14866-14870
- Hasegawa M, Cuenda A, Spillantini MG, Thomas GM, Buee-Scherrer V, Cohen P, Goedert M (1999) Stress-activated protein kinase-3 interacts with the PDZ domain of alpha1-syntrophin. A mechanism for specific substrate recognition. *The Journal of biological chemistry* **274**: 12626-12631



Hazzalin CA, Cano E, Cuenda A, Barratt MJ, Cohen P, Mahadevan LC (1996) p38/RK is essential for stress-induced nuclear responses: JNK/SAPKs and c-Jun/ATF-2 phosphorylation are insufficient. *Curr Biol* **6**: 1028-1031

Heasman SJ, Ridley AJ (2008) Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nature reviews* **9**: 690-701

Henrich LM, Smith JA, Kitt D, Errington TM, Nguyen B, Traish AM, Lannigan DA (2003) Extracellular signal-regulated kinase 7, a regulator of hormone-dependent estrogen receptor destruction. *Molecular and cellular biology* **23**: 5979-5988

Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A, Karin M (1993) Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes & development* **7**: 2135-2148

Hinds TD, Jr., Sanchez ER (2008) Protein phosphatase 5. *The international journal of biochemistry & cell biology* **40**: 2358-2362

Hinnebusch AG (1984) Evidence for translational regulation of the activator of general amino acid control in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **81**: 6442-6446

Hinnebusch AG (1993) Gene-specific translational control of the yeast GCN4 gene by phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2. *Mol Microbiol* **10**: 215-223

Hinnebusch AG (2005) Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast. *Annual review of microbiology* **59**: 407-450

Ho DT, Bardwell AJ, Grewal S, Iverson C, Bardwell L (2006) Interacting JNK-docking sites in MKK7 promote binding and activation of JNK mitogen-activated protein kinases. *The Journal of biological chemistry* **281**: 13169-13179

Holcik M, Sonenberg N (2005) Translational control in stress and apoptosis. *Nature reviews* **6**: 318-327

Holz MK, Ballif BA, Gygi SP, Blenis J (2005) mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell* **123**: 569-580

Hosoi T, Sugikawa E, Chikada A, Koguchi Y, Ohnuki T (2005) TG1019/OXE, a Galpha(i/o)-protein-coupled receptor, mediates 5-oxo-eicosatetraenoic acid-induced chemotaxis. *Biochemical and biophysical research communications* **334**: 987-995

Huang C, Ma WY, Maxiner A, Sun Y, Dong Z (1999) p38 kinase mediates UV-induced phosphorylation of p53 protein at serine 389. *The Journal of biological chemistry* **274**: 12229-12235

Huang J, Manning BD (2009) A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes. *Biochemical Society transactions* **37**: 217-222

Hundal HS, Taylor PM (2009) Amino Acid Transceptors: Gate Keepers Of Nutrient Exchange And Regulators Of Nutrient Signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab*

Hurlstone A, Clevers H (2002) T-cell factors: turn-ons and turn-offs. *The EMBO journal* **21**: 2303-2311

Hutson RG, Kilberg MS (1994) Cloning of rat asparagine synthetase and specificity of the amino acid- dependent control of its mRNA content. *The Biochemical journal* **304**: 745-750

Hyatt SL, Aulak KS, Malandro M, Kilberg MS, Hatzoglou M (1997) Adaptive regulation of the cationic amino acid transporter-1 (Cat-1) in Fao cells. *The Journal of biological chemistry* **272**: 19951-19957

Iismaa SE, Begg GE, Graham RM (2006) Cross-linking transglutaminases with G protein-coupled receptor signaling. *Sci STKE* **2006**: pe34

Ikenoue T, Inoki K, Yang Q, Zhou X, Guan KL (2008) Essential function of TORC2 in PKC and Akt turn motif phosphorylation, maturation and signalling. *The EMBO journal* **27**: 1919-1931

Iraqi I, Vissers S, Bernard F, de Craene JO, Boles E, Urrestarazu A, Andre B (1999) Amino acid signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: a permease-like sensor of external amino acids and F-Box protein Grr1p are required for transcriptional induction of the AGP1 gene, which encodes a broad- specificity amino acid permease. *Molecular and cellular biology* **19**: 989-1001.

Ishitani T, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K (2003) Regulation of lymphoid enhancer factor 1/T-cell factor by mitogen-activated protein kinase-related Nemo-like kinase-dependent phosphorylation in Wnt/beta-catenin signaling. *Molecular and cellular biology* **23**: 1379-1389

Ishitani T, Ninomiya-Tsuji J, Nagai S, Nishita M, Meneghini M, Barker N, Waterman M, Bowerman B, Clevers H, Shibuya H, Matsumoto K (1999) The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signalling between beta-catenin and transcription factor TCF. *Nature* **399**: 798-802

Jaeschke A, Rincon M, Doran B, Reilly J, Neuberg D, Greiner DL, Shultz LD, Rossini AA, Flavell RA, Davis RJ (2005) Disruption of the Jnk2 (Mapk9) gene reduces destructive insulinitis and diabetes in a mouse model of type I diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 6931-6935

Jahoor F, Badaloo A, Reid M, Forrester T (2008) Protein metabolism in severe childhood malnutrition. *Annals of tropical paediatrics* **28**: 87-101

Janknecht R, Hunter T (1997) Convergence of MAP kinase pathways on the ternary complex factor Sap-1a. *The EMBO journal* **16**: 1620-1627

Janssens S, Beyaert R (2003) Functional diversity and regulation of different interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family members. *Molecular cell* **11**: 293-302

Jenuwein T, Allis CD (2001) Translating the histone code. *Science (New York, NY)* **293**: 1074-1080

Jiang HY, Wek SA, McGrath BC, Lu D, Hai T, Harding HP, Wang X, Ron D, Cavener DR, Wek RC (2004) Activating transcription factor 3 is integral to the eukaryotic initiation factor 2 kinase stress response. *Molecular and cellular biology* **24**: 1365-1377

Jiang Y, Chen C, Li Z, Guo W, Gegner JA, Lin S, Han J (1996) Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). *The Journal of biological chemistry* **271**: 17920-17926

Jin C, Kato K, Chimura T, Yamasaki T, Nakade K, Murata T, Li H, Pan J, Zhao M, Sun K, Chiu R, Ito T, Nagata K, Horikoshi M, Yokoyama KK (2006) Regulation of histone acetylation and nucleosome assembly by transcription factor JDP2. *Nature structural & molecular biology* **13**: 331-338

Jousse C, Bruhat A, Ferrara M, Fafournoux P (1998) Physiological concentration of amino acids regulates insulin-like- growth-factor-binding protein 1 expression. *The Biochemical journal* **334**: 147-153

Jousse C, Deval C, Maurin AC, Parry L, Cherasse Y, Chaveroux C, Lefloch R, Lenormand P, Bruhat A, Fafournoux P (2007) TRB3 inhibits the transcriptional activation of stress-regulated genes by a negative feedback on the ATF4 pathway. *The Journal of biological chemistry* **282**: 15851-15861

Junttila MR, Li SP, Westermarck J (2008) Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *Faseb J* **22**: 954-965

Kallunki T, Su B, Tsigelny I, Sluss HK, Derijard B, Moore G, Davis R, Karin M (1994) JNK2 contains a specificity-determining region responsible for efficient c-Jun binding and phosphorylation. *Genes & development* **8**: 2996-3007

Kamakura S, Moriguchi T, Nishida E (1999) Activation of the protein kinase ERK5/BMK1 by receptor tyrosine kinases. Identification and characterization of a signaling pathway to the nucleus. *The Journal of biological chemistry* **274**: 26563-26571

Kanei-Ishii C, Ninomiya-Tsuji J, Tanikawa J, Nomura T, Ishitani T, Kishida S, Kokura K, Kurahashi T, Ichikawa-Iwata E, Kim Y, Matsumoto K, Ishii S (2004) Wnt-1 signal induces phosphorylation and degradation of c-Myb protein via TAK1, HIPK2, and NLK. *Genes & development* **18**: 816-829

Kannan N, Neuwald AF (2004) Evolutionary constraints associated with functional specificity of the CMGC protein kinases MAPK, CDK, GSK, SRPK, DYRK, and CK2alpha. *Protein Sci* **13**: 2059-2077

Kara CJ, Liou HC, Ivashkiv LB, Glimcher LH (1990) A cDNA for a human cyclic AMP response element-binding protein which is distinct from CREB and expressed preferentially in brain. *Molecular and cellular biology* **10**: 1347-1357

- Karanam B, Wang L, Wang D, Liu X, Marmorstein R, Cotter R, Cole PA (2007) Multiple roles for acetylation in the interaction of p300 HAT with ATF-2. *Biochemistry* **46**: 8207-8216
- Karandikar M, Xu S, Cobb MH (2000) MEKK1 binds raf-1 and the ERK2 cascade components. *The Journal of biological chemistry* **275**: 40120-40127
- Karpinski BA, Morle GD, Huggenvik J, Uhler MD, Leiden JM (1992) Molecular cloning of human CREB-2: an ATF/CREB transcription factor that can negatively regulate transcription from the cAMP response element. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 4820-4824
- Karreth FA, Tuveson DA (2009) Modelling oncogenic Ras/Raf signalling in the mouse. *Current opinion in genetics & development* **19**: 4-11
- Kato Y, Kravchenko VV, Tapping RI, Han J, Ulevitch RJ, Lee JD (1997) BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C. *The EMBO journal* **16**: 7054-7066
- Kato Y, Zhao M, Morikawa A, Sugiyama T, Chakravorty D, Koide N, Yoshida T, Tapping RI, Yang Y, Yokochi T, Lee JD (2000) Big mitogen-activated kinase regulates multiple members of the MEF2 protein family. *The Journal of biological chemistry* **275**: 18534-18540
- Kawai T, Matsumoto M, Takeda K, Sanjo H, Akira S (1998) ZIP kinase, a novel serine/threonine kinase which mediates apoptosis. *Molecular and cellular biology* **18**: 1642-1651
- Kawasaki H, Schiltz L, Chiu R, Itakura K, Taira K, Nakatani Y, Yokoyama KK (2000) ATF-2 has intrinsic histone acetyltransferase activity which is modulated by phosphorylation. *Nature* **405**: 195-200
- Kelkar N, Standen CL, Davis RJ (2005) Role of the JIP4 scaffold protein in the regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Molecular and cellular biology* **25**: 2733-2743
- Keyse SM (2000) Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. *Current opinion in cell biology* **12**: 186-192
- Kilberg MS, Shan J, Su N (2009) ATF4-dependent transcription mediates signaling of amino acid limitation. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*
- Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM (2002) mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* **110**: 163-175
- Kim L, Del Rio L, Butcher BA, Mogensen TH, Paludan SR, Flavell RA, Denkers EY (2005) p38 MAPK autophosphorylation drives macrophage IL-12 production during intracellular infection. *J Immunol* **174**: 4178-4184

Kirkpatrick CR, Schimmel P (1995) Detection of leucine-independent DNA site occupancy of the yeast Leu3p transcriptional activator in vivo. *Molecular and cellular biology* **15**: 4021-4030

Klann E, Dever TE (2004) Biochemical mechanisms for translational regulation in synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* **5**: 931-942

Klevernic IV, Stafford MJ, Morrice N, Pegg M, Morton S, Cohen P (2006) Characterization of the reversible phosphorylation and activation of ERK8. *The Biochemical journal* **394**: 365-373

Klumpp S, Thissen MC, Krieglstein J (2006) Protein phosphatases types 2C $\alpha$  and 2C $\beta$  in apoptosis. *Biochemical Society transactions* **34**: 1370-1375

Kohlhaw GB (2003) Leucine biosynthesis in fungi: entering metabolism through the back door. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**: 1-15, table of contents

Kojima H, Sasaki T, Ishitani T, Iemura S, Zhao H, Kaneko S, Kunimoto H, Natsume T, Matsumoto K, Nakajima K (2005) STAT3 regulates Nemo-like kinase by mediating its interaction with IL-6-stimulated TGF $\beta$ -activated kinase 1 for STAT3 Ser-727 phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 4524-4529

Kondoh K, Nishida E (2007) Regulation of MAP kinases by MAP kinase phosphatases. *Biochimica et biophysica acta* **1773**: 1227-1237

Kondoh K, Terasawa K, Morimoto H, Nishida E (2006) Regulation of nuclear translocation of extracellular signal-regulated kinase 5 by active nuclear import and export mechanisms. *Molecular and cellular biology* **26**: 1679-1690

Kortenjann M, Nehls M, Smith AJ, Carsetti R, Schuler J, Kohler G, Boehm T (2001) Abnormal bone marrow stroma in mice deficient for nemo-like kinase, Nlk. *European journal of immunology* **31**: 3580-3587

Koushika SP (2008) "JIP"ing along the axon: the complex roles of JIPs in axonal transport. *Bioessays* **30**: 10-14

Kuan CY, Yang DD, Samanta Roy DR, Davis RJ, Rakic P, Flavell RA (1999) The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. *Neuron* **22**: 667-676

Kubota H, Ota K, Sakaki Y, Ito T (2001) Budding yeast GCN1 binds the GI domain to activate the eIF2 $\alpha$  kinase GCN2. *The Journal of biological chemistry* **276**: 17591-17596

Kuma Y, Campbell DG, Cuenda A (2004) Identification of glycogen synthase as a new substrate for stress-activated protein kinase 2b/p38 $\beta$ . *The Biochemical journal* **379**: 133-139

Kuma Y, Sabio G, Bain J, Shpiro N, Marquez R, Cuenda A (2005) BIRB796 inhibits all p38 MAPK isoforms in vitro and in vivo. *The Journal of biological chemistry* **280**: 19472-19479

Kumar S, McDonnell PC, Gum RJ, Hand AT, Lee JC, Young PR (1997) Novel homologues of CSBP/p38 MAP kinase: activation, substrate specificity and sensitivity to inhibition by pyridinyl imidazoles. *Biochemical and biophysical research communications* **235**: 533-538

Kurokawa K, Itoh RE, Yoshizaki H, Nakamura YO, Matsuda M (2004) Coactivation of Rac1 and Cdc42 at lamellipodia and membrane ruffles induced by epidermal growth factor. *Molecular biology of the cell* **15**: 1003-1010

Kyriakis JM, Avruch J (1990) pp54 microtubule-associated protein 2 kinase. A novel serine/threonine protein kinase regulated by phosphorylation and stimulated by poly-L-lysine. *The Journal of biological chemistry* **265**: 17355-17363

Kyriakis JM, Avruch J (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* **81**: 807-869

Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, Avruch J, Woodgett JR (1994) The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* **369**: 156-160

Lacoste N, Cote J (2003) [The epigenetic code of histones]. *Med Sci (Paris)* **19**: 955-959

Lai HS, Lee JC, Lee PH, Wang ST, Chen WJ (2005) Plasma free amino acid profile in cancer patients. *Seminars in cancer biology* **15**: 267-276

Lammers T, Lavi S (2007) Role of type 2C protein phosphatases in growth regulation and in cellular stress signaling. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* **42**: 437-461

Laplane M, Sabatini DM (2009) mTOR signaling at a glance. *Journal of cell science* **122**: 3589-3594

Lawler S, Fleming Y, Goedert M, Cohen P (1998) Synergistic activation of SAPK1/JNK1 by two MAP kinase kinases in vitro. *Curr Biol* **8**: 1387-1390

Lee CM, Onesime D, Reddy CD, Dhanasekaran N, Reddy EP (2002) JLP: A scaffolding protein that tethers JNK/p38MAPK signaling modules and transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 14189-14194

Lehninger (1972) *Biochimie*.

Li MG, Katsura K, Nomiya H, Komaki K, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K, Kobayashi T, Tamura S (2003) Regulation of the interleukin-1-induced signaling pathways by a novel member of the protein phosphatase 2C family (PP2Cepsilon). *The Journal of biological chemistry* **278**: 12013-12021

Li XY, Green MR (1996) Intramolecular inhibition of activating transcription factor-2 function by its DNA-binding domain. *Genes & development* **10**: 517-527

- Li Z, Jiang Y, Ulevitch RJ, Han J (1996) The primary structure of p38 gamma: a new member of p38 group of MAP kinases. *Biochemical and biophysical research communications* **228**: 334-340
- Liang G, Wolfgang CD, Chen BP, Chen TH, Hai T (1996) ATF3 gene. Genomic organization, promoter, and regulation. *The Journal of biological chemistry* **271**: 1695-1701
- Liao XH, Majithia A, Huang X, Kimmel AR (2008) Growth control via TOR kinase signaling, an intracellular sensor of amino acid and energy availability, with crosstalk potential to proline metabolism. *Amino acids* **35**: 761-770
- Liu Z, Thornton J, Spirek M, Butow RA (2008) Activation of the SPS amino acid-sensing pathway in *Saccharomyces cerevisiae* correlates with the phosphorylation state of a sensor component, Ptr3. *Molecular and cellular biology* **28**: 551-563
- Livingstone C, Patel G, Jones N (1995) ATF-2 contains a phosphorylation-dependent transcriptional activation domain. *The EMBO journal* **14**: 1785-1797.
- Ljungdahl PO (2009) Amino-acid-induced signalling via the SPS-sensing pathway in yeast. *Biochemical Society transactions* **37**: 242-247
- Lloyd AC (2006) Distinct functions for ERKs? *J Biol* **5**: 13
- Loewith R, Jacinto E, Wulschleger S, Lorberg A, Crespo JL, Bonenfant D, Oppliger W, Jenoe P, Hall MN (2002) Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Molecular cell* **10**: 457-468
- Loflin P, Lever JE (2001) HuR binds a cyclic nucleotide-dependent, stabilizing domain in the 3' untranslated region of Na(+)/glucose cotransporter (SGLT1) mRNA. *FEBS letters* **509**: 267-271
- Lombroso PJ, Murdoch G, Lerner M (1991) Molecular characterization of a protein-tyrosine-phosphatase enriched in striatum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**: 7242-7246
- Lopez-Fontanals M, Rodriguez-Mulero S, Casado FJ, Derijard B, Pastor-Anglada M (2003) The osmoregulatory and the amino acid-regulated responses of system A are mediated by different signal transduction pathways. *The Journal of general physiology* **122**: 5-16
- Lopez-Ilasaca M (1998) Signaling from G-protein-coupled receptors to mitogen-activated protein (MAP)-kinase cascades. *Biochemical pharmacology* **56**: 269-277
- Lu X, Nemoto S, Lin A (1997) Identification of c-Jun NH2-terminal protein kinase (JNK)-activating kinase 2 as an activator of JNK but not p38. *The Journal of biological chemistry* **272**: 24751-24754
- Lu X, Nguyen TA, Moon SH, Darlington Y, Sommer M, Donehower LA (2008) The type 2C phosphatase Wip1: an oncogenic regulator of tumor suppressor and DNA damage response pathways. *Cancer metastasis reviews* **27**: 123-135

Lucchini G, Hinnebusch AG, Chen C, Fink GR (1984) Positive regulatory interactions of the HIS4 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **4**: 1326-1333

Ma XM, Blenis J (2009) Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nature reviews* **10**: 307-318

Maekawa T, Bernier F, Sato M, Nomura S, Singh M, Inoue Y, Tokunaga T, Imai H, Yokoyama M, Reimold A, Glimcher LH, Ishii S (1999) Mouse ATF-2 null mutants display features of a severe type of meconium aspiration syndrome. *The Journal of biological chemistry* **274**: 17813-17819

Maekawa T, Sakura H, Kanei-Ishii C, Sudo T, Yoshimura T, Fujisawa J, Yoshida M, Ishii S (1989) Leucine zipper structure of the protein CRE-BP1 binding to the cyclic AMP response element in brain. *The EMBO journal* **8**: 2023-2028

Mahtani KR, Brook M, Dean JL, Sully G, Saklatvala J, Clark AR (2001) Mitogen-activated protein kinase p38 controls the expression and posttranslational modification of tristetraprolin, a regulator of tumor necrosis factor alpha mRNA stability. *Molecular and cellular biology* **21**: 6461-6469

Marais R, Light Y, Paterson HF, Marshall CJ (1995) Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation. *The EMBO journal* **14**: 3136-3145

Marieb (1999) Anatomie et physiologie humaines. Université DB (ed), 4ème edition edn.

Marshall MS (1995) Ras target proteins in eukaryotic cells. *Faseb J* **9**: 1311-1318

Marten NW, Burke EJ, Hayden JM, Straus DS (1994) Effect of amino acid limitation on the expression of 19 genes in rat hepatoma cells. *Faseb J* **8**: 538-544

Maurin AC, Jousse C, Averous J, Parry L, Bruhat A, Cherasse Y, Zeng H, Zhang Y, Harding HP, Ron D, Fafournoux P (2005) The GCN2 kinase biases feeding behavior to maintain amino acid homeostasis in omnivores. *Cell Metab* **1**: 273-277

May LT, Hill SJ (2008) ERK phosphorylation: spatial and temporal regulation by G protein-coupled receptors. *The international journal of biochemistry & cell biology* **40**: 2013-2017

Mazzucchelli C, Vantaggiato C, Ciamei A, Fasano S, Pakhotin P, Krezel W, Welzl H, Wolfer DP, Pages G, Valverde O, Marowsky A, Porrazzo A, Orban PC, Maldonado R, Ehrenguber MU, Cestari V, Lipp HP, Chapman PF, Pouyssegur J, Brambilla R (2002) Knockout of ERK1 MAP kinase enhances synaptic plasticity in the striatum and facilitates striatal-mediated learning and memory. *Neuron* **34**: 807-820

McCaw BJ, Chow SY, Wong ES, Tan KL, Guo H, Guy GR (2005) Identification and characterization of mErk5-T, a novel Erk5/Bmk1 splice variant. *Gene* **345**: 183-190

McLaughlin MM, Kumar S, McDonnell PC, Van Horn S, Lee JC, Livi GP, Young PR (1996) Identification of mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase-3, a novel substrate of CSBP p38 MAP kinase. *The Journal of biological chemistry* **271**: 8488-8492



- Meloche S, Pouyssegur J (2007) The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene* **26**: 3227-3239
- Mertens S, Craxton M, Goedert M (1996) SAP kinase-3, a new member of the family of mammalian stress-activated protein kinases. *FEBS letters* **383**: 273-276
- Minich WB, Balasta ML, Goss DJ, Rhoads RE (1994) Chromatographic resolution of in vivo phosphorylated and nonphosphorylated eukaryotic translation initiation factor eIF-4E: increased cap affinity of the phosphorylated form. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 7668-7672
- Mittelstadt PR, Salvador JM, Fornace AJ, Jr., Ashwell JD (2005) Activating p38 MAPK: new tricks for an old kinase. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* **4**: 1189-1192
- Mochizuki N, Ohba Y, Kiyokawa E, Kurata T, Murakami T, Ozaki T, Kitabatake A, Nagashima K, Matsuda M (1999) Activation of the ERK/MAPK pathway by an isoform of rap1GAP associated with G alpha(i). *Nature* **400**: 891-894
- Mody N, Campbell DG, Morrice N, Pegg M, Cohen P (2003) An analysis of the phosphorylation and activation of extracellular-signal-regulated protein kinase 5 (ERK5) by mitogen-activated protein kinase kinase 5 (MKK5) in vitro. *The Biochemical journal* **372**: 567-575
- Mor A, Philips MR (2006) Compartmentalized Ras/MAPK signaling. *Annu Rev Immunol* **24**: 771-800
- Morita K, Saitoh M, Tobiume K, Matsuura H, Enomoto S, Nishitoh H, Ichijo H (2001) Negative feedback regulation of ASK1 by protein phosphatase 5 (PP5) in response to oxidative stress. *The EMBO journal* **20**: 6028-6036
- Morris SM, Jr. (2006) Arginine: beyond protein. *The American journal of clinical nutrition* **83**: 508S-512S
- Morrison DK, Davis RJ (2003) Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annual review of cell and developmental biology* **19**: 91-118
- Morton S, Davis RJ, Cohen P (2004) Signalling pathways involved in multisite phosphorylation of the transcription factor ATF-2. *FEBS letters* **572**: 177-183
- Muda M, Boschert U, Smith A, Antonsson B, Gillieron C, Chabert C, Camps M, Martinou I, Ashworth A, Arkinstall S (1997) Molecular cloning and functional characterization of a novel mitogen-activated protein kinase phosphatase, MKP-4. *The Journal of biological chemistry* **272**: 5141-5151
- Mudgett JS, Ding J, Guh-Siesel L, Chartrain NA, Yang L, Gopal S, Shen MM (2000) Essential role for p38alpha mitogen-activated protein kinase in placental angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 10454-10459

- Mueller PP, Jackson BM, Miller PF, Hinnebusch AG (1988) The first and fourth upstream open reading frames in GCN4 mRNA have similar initiation efficiencies but respond differently in translational control to change in length and sequence. *Molecular and cellular biology* **8**: 5439-5447
- Mulvaney JM, Roberson MS (2000) Divergent signaling pathways requiring discrete calcium signals mediate concurrent activation of two mitogen-activated protein kinases by gonadotropin-releasing hormone. *The Journal of biological chemistry* **275**: 14182-14189
- Mulvaney JM, Zhang T, Fewtrell C, Roberson MS (1999) Calcium influx through L-type channels is required for selective activation of extracellular signal-regulated kinase by gonadotropin-releasing hormone. *The Journal of biological chemistry* **274**: 29796-29804
- Murphy LO, Blenis J (2006) MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends in biochemical sciences* **31**: 268-275
- Nagy Z, Tora L (2007) Distinct GCN5/PCAF-containing complexes function as co-activators and are involved in transcription factor and global histone acetylation. *Oncogene* **26**: 5341-5357
- Nair KS, Short KR (2005) Hormonal and signaling role of branched-chain amino acids. *The Journal of nutrition* **135**: 1547S-1552S
- Naor Z, Benard O, Seger R (2000) Activation of MAPK cascades by G-protein-coupled receptors: the case of gonadotropin-releasing hormone receptor. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **11**: 91-99
- New L, Jiang Y, Zhao M, Liu K, Zhu W, Flood LJ, Kato Y, Parry GC, Han J (1998) PRAK, a novel protein kinase regulated by the p38 MAP kinase. *The EMBO journal* **17**: 3372-3384
- Newbury SF (2006) Control of mRNA stability in eukaryotes. *Biochemical Society transactions* **34**: 30-34
- Newsholme P, Bender K, Kiely A, Brennan L (2007) Amino acid metabolism, insulin secretion and diabetes. *Biochemical Society transactions* **35**: 1180-1186
- Nishida M, Maruyama Y, Tanaka R, Kontani K, Nagao T, Kurose H (2000) G alpha(i) and G alpha(o) are target proteins of reactive oxygen species. *Nature* **408**: 492-495
- Nomura N, Zu YL, Maekawa T, Tabata S, Akiyama T, Ishii S (1993) Isolation and characterization of a novel member of the gene family encoding the cAMP response element-binding protein CRE-BP1. *The Journal of biological chemistry* **268**: 4259-4266
- Nozaki J, Kubota H, Yoshida H, Naitoh M, Goji J, Yoshinaga T, Mori K, Koizumi A, Nagata K (2004) The endoplasmic reticulum stress response is stimulated through the continuous activation of transcription factors ATF6 and XBP1 in Ins2+/Akita pancreatic beta cells. *Genes Cells* **9**: 261-270
- Oakley MG, Dervan PB (1990) Structural motif of the GCN4 DNA binding domain characterized by affinity cleaving. *Science (New York, NY)* **248**: 847-850

Ogata M, Oh-hora M, Kosugi A, Hamaoka T (1999) Inactivation of mitogen-activated protein kinases by a mammalian tyrosine-specific phosphatase, PTPBR7. *Biochemical and biophysical research communications* **256**: 52-56

Oh DY, Kim K, Kwon HB, Seong JY (2006) Cellular and molecular biology of orphan G protein-coupled receptors. *International review of cytology* **252**: 163-218

Ohkawara B, Shirakabe K, Hyodo-Miura J, Matsuo R, Ueno N, Matsumoto K, Shibuya H (2004) Role of the TAK1-NLK-STAT3 pathway in TGF-beta-mediated mesoderm induction. *Genes & development* **18**: 381-386

Oishi I, Suzuki H, Onishi N, Takada R, Kani S, Ohkawara B, Koshida I, Suzuki K, Yamada G, Schwabe GC, Mundlos S, Shibuya H, Takada S, Minami Y (2003) The receptor tyrosine kinase Ror2 is involved in non-canonical Wnt5a/JNK signalling pathway. *Genes Cells* **8**: 645-654

Ouwens DM, de Ruiter ND, van der Zon GC, Carter AP, Schouten J, van der Burgt C, Kooistra K, Bos JL, Maassen JA, van Dam H (2002) Growth factors can activate ATF2 via a two-step mechanism: phosphorylation of Thr71 through the Ras-MEK-ERK pathway and of Thr69 through RalGDS-Src-p38. *The EMBO journal* **21**: 3782-3793

Owens DM, Keyse SM (2007) Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene* **26**: 3203-3213

Oyadomari S, Koizumi A, Takeda K, Gotoh T, Akira S, Araki E, Mori M (2002) Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes. *The Journal of clinical investigation* **109**: 525-532

Pages G, Guerin S, Grall D, Bonino F, Smith A, Anjuere F, Auberger P, Pouyssegur J (1999) Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science (New York, NY)* **286**: 1374-1377

Palii SS, Chen H, Kilberg MS (2004) Transcriptional control of the human sodium-coupled neutral amino acid transporter system A gene by amino acid availability is mediated by an intronic element. *The Journal of biological chemistry* **279**: 3463-3471

Pan YX, Chen H, Kilberg MS (2005) Interaction of RNA-binding proteins HuR and AUF1 with the human ATF3 mRNA 3'-untranslated region regulates its amino acid limitation-induced stabilization. *The Journal of biological chemistry* **280**: 34609-34616

Pan YX, Chen H, Thiaville MM, Kilberg MS (2007) Activation of the ATF3 gene through a co-ordinated amino acid-sensing response programme that controls transcriptional regulation of responsive genes following amino acid limitation. *The Biochemical journal* **401**: 299-307

Papp LV, Lu J, Holmgren A, Khanna KK (2007) From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxidants & redox signaling* **9**: 775-806

Patterson KI, Brummer T, O'Brien PM, Daly RJ (2009) Dual-specificity phosphatases: critical regulators with diverse cellular targets. *The Biochemical journal* **418**: 475-489

Paul S, Nairn AC, Wang P, Lombroso PJ (2003) NMDA-mediated activation of the tyrosine phosphatase STEP regulates the duration of ERK signaling. *Nature neuroscience* **6**: 34-42

Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* **22**: 153-183

Peng T, Golub TR, Sabatini DM (2002) The immunosuppressant rapamycin mimics a starvation-like signal distinct from amino acid and glucose deprivation. *Molecular and cellular biology* **22**: 5575-5584

Perander M, Keyse SM, Seternes OM (2008) Does MK5 reconcile classical and atypical MAP kinases? *Front Biosci* **13**: 4617-4624

Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ (2002) Seven-transmembrane receptors. *Nature reviews* **3**: 639-650

Pohlandt F (1974) Cystine: a semi-essential amino acid in the newborn infant. *Acta paediatrica Scandinavica* **63**: 801-804

Price MA, Cruzalegui FH, Treisman R (1996) The p38 and ERK MAP kinase pathways cooperate to activate Ternary Complex Factors and c-fos transcription in response to UV light. *The EMBO journal* **15**: 6552-6563

Prickett TD, Brautigan DL (2007) Cytokine activation of p38 mitogen-activated protein kinase and apoptosis is opposed by alpha-4 targeting of protein phosphatase 2A for site-specific dephosphorylation of MEK3. *Molecular and cellular biology* **27**: 4217-4227

Proud CG (2004) mTOR-mediated regulation of translation factors by amino acids. *Biochemical and biophysical research communications* **313**: 429-436

Proud CG (2006) Regulation of protein synthesis by insulin. *Biochemical Society transactions* **34**: 213-216

Pulido R, Zuniga A, Ullrich A (1998) PTP-SL and STEP protein tyrosine phosphatases regulate the activation of the extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 by association through a kinase interaction motif. *The EMBO journal* **17**: 7337-7350

Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ (1995) Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *The Journal of biological chemistry* **270**: 7420-7426

Raingeaud J, Whitmarsh AJ, Barrett T, Derijard B, Davis RJ (1996) MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Molecular and cellular biology* **16**: 1247-1255

Raman M, Chen W, Cobb MH (2007) Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* **26**: 3100-3112

Raman M, Cobb MH (2003) MAP kinase modules: many roads home. *Curr Biol* **13**: R886-888

Ramirez M, Wek RC, Hinnebusch AG (1991) Ribosome association of GCN2 protein kinase, a translational activator of the GCN4 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **11**: 3027-3036

Rana TM (2007) Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nature reviews* **8**: 23-36

Raven JF, Koromilas AE (2008) PERK and PKR: old kinases learn new tricks. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* **7**: 1146-1150

Ray LB, Sturgill TW (1988) Characterization of insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase. Rapid isolation and stabilization of a novel serine/threonine kinase from 3T3-L1 cells. *The Journal of biological chemistry* **263**: 12721-12727

Regan CP, Li W, Boucher DM, Spatz S, Su MS, Kuida K (2002) Erk5 null mice display multiple extraembryonic vascular and embryonic cardiovascular defects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 9248-9253

Reiling JH, Sabatini DM (2006) Stress and mTOR signaling. *Oncogene* **25**: 6373-6383

Reimold AM, Grusby MJ, Kosaras B, Fries JW, Mori R, Maniwa S, Clauss IM, Collins T, Sidman RL, Glimcher MJ, Glimcher LH (1996) Chondrodysplasia and neurological abnormalities in ATF-2-deficient mice. *Nature* **379**: 262-265

Renshaw MW, Ren XD, Schwartz MA (1997) Growth factor activation of MAP kinase requires cell adhesion. *The EMBO journal* **16**: 5592-5599

Repasky GA, Chenette EJ, Der CJ (2004) Renewing the conspiracy theory debate: does Raf function alone to mediate Ras oncogenesis? *Trends in cell biology* **14**: 639-647

Richards NG, Kilberg MS (2006) Asparagine synthetase chemotherapy. *Annual review of biochemistry* **75**: 629-654

Roberson MS, Ban M, Zhang T, Mulvaney JM (2000) Role of the cyclic AMP response element binding complex and activation of mitogen-activated protein kinases in synergistic activation of the glycoprotein hormone alpha subunit gene by epidermal growth factor and forskolin. *Molecular and cellular biology* **20**: 3331-3344

Rohan PJ, Davis P, Moskaluk CA, Kearns M, Krutzsch H, Siebenlist U, Kelly K (1993) PAC-1: a mitogen-induced nuclear protein tyrosine phosphatase. *Science (New York, NY)* **259**: 1763-1766

Romano PR, Garcia-Barrio MT, Zhang X, Wang Q, Taylor DR, Zhang F, Herring C, Mathews MB, Qin J, Hinnebusch AG (1998) Autophosphorylation in the activation loop is required for full kinase activity in vivo of human and yeast eukaryotic initiation factor 2alpha kinases PKR and GCN2. *Molecular and cellular biology* **18**: 2282-2297

Ron D, Habener JF (1992) CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant- negative inhibitor of gene transcription. *Genes & development* **6**: 439-453

Rose WC (1937) The Nutritive Significance of the Amino Acids and Certain Related Compounds. *Science (New York, NY)* **86**: 298-300

Rossomando AJ, Payne DM, Weber MJ, Sturgill TW (1989) Evidence that pp42, a major tyrosine kinase target protein, is a mitogen-activated serine/threonine protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**: 6940-6943

Rouse J, Cohen P, Trigon S, Morange M, Alonso-Llamazares A, Zamanillo D, Hunt T, Nebreda AR (1994) A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* **78**: 1027-1037

Rozengurt E (2007) Mitogenic signaling pathways induced by G protein-coupled receptors. *J Cell Physiol* **213**: 589-602

Rudd CE (2005) MAPK p38: alternative and nonstressful in T cells. *Nature immunology* **6**: 368-370

Saba-El-Leil MK, Vella FD, Vernay B, Voisin L, Chen L, Labrecque N, Ang SL, Meloche S (2003) An essential function of the mitogen-activated protein kinase Erk2 in mouse trophoblast development. *EMBO reports* **4**: 964-968

Sabapathy K, Jochum W, Hochedlinger K, Chang L, Karin M, Wagner EF (1999) Defective neural tube morphogenesis and altered apoptosis in the absence of both JNK1 and JNK2. *Mech Dev* **89**: 115-124

Sabio G, Arthur JS, Kuma Y, Pegg M, Carr J, Murray-Tait V, Centeno F, Goedert M, Morrice NA, Cuenda A (2005) p38gamma regulates the localisation of SAP97 in the cytoskeleton by modulating its interaction with GKAP. *The EMBO journal* **24**: 1134-1145

Sabio G, Das M, Mora A, Zhang Z, Jun JY, Ko HJ, Barrett T, Kim JK, Davis RJ (2008) A stress signaling pathway in adipose tissue regulates hepatic insulin resistance. *Science (New York, NY)* **322**: 1539-1543

Saito J, Toriumi S, Awano K, Ichijo H, Sasaki K, Kobayashi T, Tamura S (2007) Regulation of apoptosis signal-regulating kinase 1 by protein phosphatase 2Cepsilon. *The Biochemical journal* **405**: 591-596

Schaeffer HJ, Weber MJ (1999) Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Molecular and cellular biology* **19**: 2435-2444

Schmitt JM, Stork PJ (2002) Galpha and Gbeta gamma require distinct Src-dependent pathways to activate Rap1 and Ras. *The Journal of biological chemistry* **277**: 43024-43032

Schnabel P, Mies F, Nohr T, Geisler M, Bohm M (2000) Differential regulation of phospholipase C-beta isozymes in cardiomyocyte hypertrophy. *Biochemical and biophysical research communications* **275**: 1-6

Schwindinger WF, Robishaw JD (2001) Heterotrimeric G-protein betagamma-dimers in growth and differentiation. *Oncogene* **20**: 1653-1660

Seifert R, Wenzel-Seifert K (2002) Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* **366**: 381-416

Selcher JC, Nekrasova T, Paylor R, Landreth GE, Sweatt JD (2001) Mice lacking the ERK1 isoform of MAP kinase are unimpaired in emotional learning. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, NY)* **8**: 11-19

Seo M, Lee YI, Cho CH, Bae CD, Kim IH, Juhnn YS (2002) Bi-directional regulation of UV-induced activation of p38 kinase and c-Jun N-terminal kinase by G protein beta gamma-subunits. *The Journal of biological chemistry* **277**: 24197-24203

Shahbazian D, Roux PP, Mieulet V, Cohen MS, Raught B, Taunton J, Hershey JW, Blenis J, Pende M, Sonenberg N (2006) The mTOR/PI3K and MAPK pathways converge on eIF4B to control its phosphorylation and activity. *The EMBO journal* **25**: 2781-2791

Shan J, Ord D, Ord T, Kilberg MS (2009) Elevated ATF4 expression, in the absence of other signals, is sufficient for transcriptional induction via CCAAT enhancer-binding protein-activating transcription factor response elements. *The Journal of biological chemistry* **284**: 21241-21248

Sharrocks AD, Yang SH, Galanis A (2000) Docking domains and substrate-specificity determination for MAP kinases. *Trends in biochemical sciences* **25**: 448-453

Shekib LA (1994) Nutritional improvement of lentils, chick pea, rice and wheat by natural fermentation. *Plant foods for human nutrition (Dordrecht, Netherlands)* **46**: 201-205

Sikorski TW, Buratowski S (2009) The basal initiation machinery: beyond the general transcription factors. *Current opinion in cell biology* **21**: 344-351

Siu F, Bain PJ, LeBlanc-Chaffin R, Chen H, Kilberg MS (2002) ATF4 is a mediator of the nutrient-sensing response pathway that activates the human asparagine synthetase gene. *The Journal of biological chemistry* **277**: 24120-24127.

Sluss HK, Barrett T, Derijard B, Davis RJ (1994) Signal transduction by tumor necrosis factor mediated by JNK protein kinases. *Molecular and cellular biology* **14**: 8376-8384

Smit L, Baas A, Kuipers J, Korswagen H, van de Wetering M, Clevers H (2004) Wnt activates the Tak1/Nemo-like kinase pathway. *The Journal of biological chemistry* **279**: 17232-17240

Smith EM, Proud CG (2008) cdc2-cyclin B regulates eEF2 kinase activity in a cell cycle- and amino acid-dependent manner. *The EMBO journal* **27**: 1005-1016

Sternweis PC, Carter AM, Chen Z, Danesh SM, Hsiung YF, Singer WD (2007) Regulation of Rho guanine nucleotide exchange factors by G proteins. *Advances in protein chemistry* **74**: 189-228

Straus DS, Burke EJ, Marten NW (1993) Induction of insulin-like growth factor binding protein-1 gene expression in liver of protein-restricted rats and in rat hepatoma cells limited for a single amino acid. *Endocrinology* **132**: 1090-1100

Straus DS, Takemoto CD (1990) Effect of dietary protein deprivation on insulin-like growth factor (IGF)-I and -II, IGF binding protein-2, and serum albumin gene expression in rat. *Endocrinology* **127**: 1849-1860

Sun W, Kesavan K, Schaefer BC, Garrington TP, Ware M, Johnson NL, Gelfand EW, Johnson GL (2001) MEKK2 associates with the adapter protein Lad/RIBP and regulates the MEK5-BMK1/ERK5 pathway. *The Journal of biological chemistry* **276**: 5093-5100

Sylvester SL, ap Rhys CM, Luethy-Martindale JD, Holbrook NJ (1994) Induction of GADD153, a CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)-related gene, during the acute phase response in rats. Evidence for the involvement of C/EBPs in regulating its expression [published erratum appears in J Biol Chem 1995 Jun 16;270(24):14842]. *The Journal of biological chemistry* **269**: 20119-20125

Sze JY, Woontner M, Jaehning JA, Kohlhaw GB (1992) In vitro transcriptional activation by a metabolic intermediate: activation by Leu3 depends on alpha-isopropylmalate [published erratum appears in Science 1993 Oct 22;262(5133):492]. *Science (New York, NY)* **258**: 1143-1145

Takeda J, Maekawa T, Sudo T, Seino Y, Imura H, Saito N, Tanaka C, Ishii S (1991) Expression of the CRE-BP1 transcriptional regulator binding to the cyclic AMP response element in central nervous system, regenerating liver, and human tumors. *Oncogene* **6**: 1009-1014

Takekawa M, Adachi M, Nakahata A, Nakayama I, Itoh F, Tsukuda H, Taya Y, Imai K (2000) p53-inducible wip1 phosphatase mediates a negative feedback regulation of p38 MAPK-p53 signaling in response to UV radiation. *The EMBO journal* **19**: 6517-6526

Takekawa M, Maeda T, Saito H (1998) Protein phosphatase 2C $\alpha$  inhibits the human stress-responsive p38 and JNK MAPK pathways. *The EMBO journal* **17**: 4744-4752

Tamura S, Toriumi S, Saito J, Awano K, Kudo TA, Kobayashi T (2006) PP2C family members play key roles in regulation of cell survival and apoptosis. *Cancer science* **97**: 563-567

Tan Y, Rouse J, Zhang A, Cariaty S, Cohen P, Comb MJ (1996) FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2. *The EMBO journal* **15**: 4629-4642

Tanabe S, Kreutz B, Suzuki N, Kozasa T (2004) Regulation of RGS-RhoGEFs by G $\alpha$ 12 and G $\alpha$ 13 proteins. *Methods in enzymology* **390**: 285-294



Tanaka N, Kamanaka M, Enslen H, Dong C, Wysk M, Davis RJ, Flavell RA (2002) Differential involvement of p38 mitogen-activated protein kinase kinases MKK3 and MKK6 in T-cell apoptosis. *EMBO reports* **3**: 785-791

Tang QQ, Lane MD (2000) Role of C/EBP homologous protein (CHOP-10) in the programmed activation of CCAAT/enhancer-binding protein-beta during adipogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 12446-12450

Tanno M, Bassi R, Gorog DA, Saurin AT, Jiang J, Heads RJ, Martin JL, Davis RJ, Flavell RA, Marber MS (2003) Diverse mechanisms of myocardial p38 mitogen-activated protein kinase activation: evidence for MKK-independent activation by a TAB1-associated mechanism contributing to injury during myocardial ischemia. *Circ Res* **93**: 254-261

Tate JJ, Georis I, Feller A, Dubois E, Cooper TG (2009) Rapamycin-induced Gln3 dephosphorylation is insufficient for nuclear localization: Sit4 and PP2A phosphatases are regulated and function differently. *The Journal of biological chemistry* **284**: 2522-2534

Teng CH, Huang WN, Meng TC (2007) Several dual specificity phosphatases coordinate to control the magnitude and duration of JNK activation in signaling response to oxidative stress. *The Journal of biological chemistry* **282**: 28395-28407

Thiaville MM, Dudenhausen EE, Zhong C, Pan YX, Kilberg MS (2008a) Deprivation of protein or amino acid induces C/EBPbeta synthesis and binding to amino acid response elements, but its action is not an absolute requirement for enhanced transcription. *The Biochemical journal* **410**: 473-484

Thiaville MM, Pan YX, Gjymishka A, Zhong C, Kaufman RJ, Kilberg MS (2008b) MEK signaling is required for phosphorylation of eIF2alpha following amino acid limitation of HepG2 human hepatoma cells. *The Journal of biological chemistry* **283**: 10848-10857

Thireos G, Penn MD, Greer H (1984) 5' untranslated sequences are required for the translational control of a yeast regulatory gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **81**: 5096-5100

Thompson NA, Haefliger JA, Senn A, Tawadros T, Magara F, Ledermann B, Nicod P, Waeber G (2001) Islet-brain1/JNK-interacting protein-1 is required for early embryogenesis in mice. *The Journal of biological chemistry* **276**: 27745-27748

Thuerauf DJ, Arnold ND, Zechner D, Hanford DS, DeMartin KM, McDonough PM, Prywes R, Glembocki CC (1998) p38 Mitogen-activated protein kinase mediates the transcriptional induction of the atrial natriuretic factor gene through a serum response element. A potential role for the transcription factor ATF6. *The Journal of biological chemistry* **273**: 20636-20643

Tobin AB, Butcher AJ, Kong KC (2008) Location, location, location...site-specific GPCR phosphorylation offers a mechanism for cell-type-specific signalling. *Trends in pharmacological sciences* **29**: 413-420

Tong BC, Barbul A (2004) Cellular and physiological effects of arginine. *Mini reviews in medicinal chemistry* **4**: 823-832

Tournier C, Dong C, Turner TK, Jones SN, Flavell RA, Davis RJ (2001) MKK7 is an essential component of the JNK signal transduction pathway activated by proinflammatory cytokines. *Genes & development* **15**: 1419-1426

Tournier C, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Barrett T, Davis RJ (1997) Mitogen-activated protein kinase kinase 7 is an activator of the c-Jun NH2-terminal kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 7337-7342

Tournier C, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Barrett T, Davis RJ (1999) The MKK7 gene encodes a group of c-Jun NH2-terminal kinase kinases. *Molecular and cellular biology* **19**: 1569-1581

Tufvesson E, Westergren-Thorsson G (2003) Biglycan and decorin induce morphological and cytoskeletal changes involving signalling by the small GTPases RhoA and Rac1 resulting in lung fibroblast migration. *Journal of cell science* **116**: 4857-4864

Turgeon B, Saba-El-Leil MK, Meloche S (2000) Cloning and characterization of mouse extracellular-signal-regulated protein kinase 3 as a unique gene product of 100 kDa. *The Biochemical journal* **346 Pt 1**: 169-175

Tvegard T, Soltani H, Skjolberg HC, Krohn M, Nilssen EA, Kearsley SE, Grallert B, Boye E (2007) A novel checkpoint mechanism regulating the G1/S transition. *Genes & development* **21**: 649-654

Ugi S, Imamura T, Ricketts W, Olefsky JM (2002) Protein phosphatase 2A forms a molecular complex with Shc and regulates Shc tyrosine phosphorylation and downstream mitogenic signaling. *Molecular and cellular biology* **22**: 2375-2387

Uhlik MT, Abell AN, Johnson NL, Sun W, Cuevas BD, Lobel-Rice KE, Horne EA, Dell'Acqua ML, Johnson GL (2003) Rac-MEKK3-MKK3 scaffolding for p38 MAPK activation during hyperosmotic shock. *Nature cell biology* **5**: 1104-1110

van Dam H, Wilhelm D, Herr I, Steffen A, Herrlich P, Angel P (1995) ATF-2 is preferentially activated by stress-activated protein kinases to mediate c-jun induction in response to genotoxic agents. *The EMBO journal* **14**: 1798-1811

Vijay R. Baichwal TSC, Paula R. Gatzek and Gunter B. Kohlhaw (1983) Leucine biosynthesis in yeast. *Curr Genet*, Vol. 7, pp. 369-377

Vlahopoulos SA, Logotheti S, Mikas D, Giarika A, Gorgoulis V, Zoumpourlis V (2008) The role of ATF-2 in oncogenesis. *Bioessays* **30**: 314-327

Vomastek T, Schaeffer HJ, Tarcsafalvi A, Smolkin ME, Bissonette EA, Weber MJ (2004) Modular construction of a signaling scaffold: MORG1 interacts with components of the ERK cascade and links ERK signaling to specific agonists. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 6981-6986

- Wagner EF, Nebreda AR (2009) Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer* **9**: 537-549
- Wang L, Ma R, Flavell RA, Choi ME (2002) Requirement of mitogen-activated protein kinase kinase 3 (MKK3) for activation of p38alpha and p38delta MAPK isoforms by TGF-beta 1 in murine mesangial cells. *The Journal of biological chemistry* **277**: 47257-47262
- Wang W, Furneaux H, Cheng H, Caldwell MC, Hutter D, Liu Y, Holbrook N, Gorospe M (2000) HuR regulates p21 mRNA stabilization by UV light. *Molecular and cellular biology* **20**: 760-769
- Wang X, Merritt AJ, Seyfried J, Guo C, Papadakis ES, Finegan KG, Kayahara M, Dixon J, Boot-Handford RP, Cartwright EJ, Mayer U, Tournier C (2005) Targeted deletion of mek5 causes early embryonic death and defects in the extracellular signal-regulated kinase 5/myocyte enhancer factor 2 cell survival pathway. *Molecular and cellular biology* **25**: 336-345
- Wang X, Tournier C (2006) Regulation of cellular functions by the ERK5 signalling pathway. *Cellular signalling* **18**: 753-760
- Wang XZ, Ron D (1996) Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase. *Science (New York, NY)* **272**: 1347-1349
- Wang Z, Chen H (2009) Amino acid limitation induces down-regulation of WNT5a at transcriptional level. *Biochemical and biophysical research communications* **378**: 789-794
- Waskiewicz AJ, Flynn A, Proud CG, Cooper JA (1997) Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *The EMBO journal* **16**: 1909-1920
- Wei Y, Yu L, Bowen J, Gorovsky MA, Allis CD (1999) Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell* **97**: 99-109
- Wek RC, Jiang HY, Anthony TG (2006) Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochemical Society transactions* **34**: 7-11
- Wek RC, Ramirez M, Jackson BM, Hinnebusch AG (1990) Identification of positive-acting domains in GCN2 protein kinase required for translational activation of GCN4 expression. *Molecular and cellular biology* **10**: 2820-2831
- Weston CR, Lambright DG, Davis RJ (2002) Signal transduction. MAP kinase signaling specificity. *Science (New York, NY)* **296**: 2345-2347
- Whitmarsh AJ, Davis RJ (1996) Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* **74**: 589-607
- Wullschleger S, Loewith R, Hall MN (2006) TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* **124**: 471-484

Yaman I, Fernandez J, Liu H, Caprara M, Komar AA, Koromilas AE, Zhou L, Snider MD, Scheuner D, Kaufman RJ, Hatzoglou M (2003) The zipper model of translational control: a small upstream ORF is the switch that controls structural remodeling of an mRNA leader. *Cell* **113**: 519-531

Yaman I, Fernandez J, Sarkar B, Schneider RJ, Snider MD, Nagy LE, Hatzoglou M (2002) Nutritional control of mRNA stability is mediated by a conserved AU-rich element that binds the cytoplasmic shuttling protein HuR. *The Journal of biological chemistry* **277**: 41539-41546

Yamauchi J, Tsujimoto G, Kaziro Y, Itoh H (2001) Parallel regulation of mitogen-activated protein kinase kinase 3 (MKK3) and MKK6 in Gq-signaling cascade. *The Journal of biological chemistry* **276**: 23362-23372

Yan C, Luo H, Lee JD, Abe J, Berk BC (2001) Molecular cloning of mouse ERK5/BMK1 splice variants and characterization of ERK5 functional domains. *The Journal of biological chemistry* **276**: 10870-10878

Yang CC, Ornatsky OI, McDermott JC, Cruz TF, Prody CA (1998a) Interaction of myocyte enhancer factor 2 (MEF2) with a mitogen-activated protein kinase, ERK5/BMK1. *Nucleic acids research* **26**: 4771-4777

Yang DD, Conze D, Whitmarsh AJ, Barrett T, Davis RJ, Rincon M, Flavell RA (1998b) Differentiation of CD4<sup>+</sup> T cells to Th1 cells requires MAP kinase JNK2. *Immunity* **9**: 575-585

Yang DD, Kuan CY, Whitmarsh AJ, Rincon M, Zheng TS, Davis RJ, Rakic P, Flavell RA (1997) Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. *Nature* **389**: 865-870

Yao Y, Li W, Wu J, Germann UA, Su MS, Kuida K, Boucher DM (2003) Extracellular signal-regulated kinase 2 is necessary for mesoderm differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 12759-12764

Yee KL, Weaver VM, Hammer DA (2008) Integrin-mediated signalling through the MAP-kinase pathway. *IET Syst Biol* **2**: 8-15

Yoon S, Seger R (2006) The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* **24**: 21-44

Yoshimoto H, Fukushige T, Yonezawa T, Sone H (2002) Genetic and physiological analysis of branched-chain alcohols and isoamyl acetate production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied microbiology and biotechnology* **59**: 501-508

Yoshioka K (2004) Scaffold proteins in mammalian MAP kinase cascades. *Journal of biochemistry* **135**: 657-661

Young VR, El-Khoury AE, Melchor S, Castillo L (1994) The biochemistry and physiology of protein and amino acid metabolism, with reference to protein nutrition. In *Protein Metabolism During Infancy*, Niels CRR (ed), Vol. 33, pp 1-28. New York: Nestec Ltd., Vevey/ Raven Press, Ltd.

Yujiri T, Ware M, Widmann C, Oyer R, Russell D, Chan E, Zaitsev Y, Clarke P, Tyler K, Oka Y, Fanger GR, Henson P, Johnson GL (2000) MEK kinase 1 gene disruption alters cell migration and c-Jun NH2-terminal kinase regulation but does not cause a measurable defect in NF-kappa B activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 7272-7277

Zagar Y, Chaumaz G, Lieberherr M (2004) Signaling cross-talk from Gbeta4 subunit to Elk-1 in the rapid action of androgens. *The Journal of biological chemistry* **279**: 2403-2413

Zanke B, Squire J, Griesser H, Henry M, Suzuki H, Patterson B, Minden M, Mak TW (1994) A hematopoietic protein tyrosine phosphatase (HePTP) gene that is amplified and overexpressed in myeloid malignancies maps to chromosome 1q32.1. *Leukemia* **8**: 236-244

Zaragoza D, Ghavidel A, Heitman J, Schultz MC (1998) Rapamycin induces the G0 program of transcriptional repression in yeast by interfering with the TOR signaling pathway. *Molecular and cellular biology* **18**: 4463-4470

Zhai P, Yamamoto M, Galeotti J, Liu J, Masurekar M, Thaisz J, Irie K, Holle E, Yu X, Kupersmidt S, Roden DM, Wagner T, Yatani A, Vatner DE, Vatner SF, Sadoshima J (2005) Cardiac-specific overexpression of AT1 receptor mutant lacking G alpha q/G alpha i coupling causes hypertrophy and bradycardia in transgenic mice. *The Journal of clinical investigation* **115**: 3045-3056

Zhan XL, Wishart MJ, Guan KL (2001) Nonreceptor tyrosine phosphatases in cellular signaling: regulation of mitogen-activated protein kinases. *Chemical reviews* **101**: 2477-2496

Zhang F, Strand A, Robbins D, Cobb MH, Goldsmith EJ (1994) Atomic structure of the MAP kinase ERK2 at 2.3 Å resolution. *Nature* **367**: 704-711

Zhang Y (2003) Transcriptional regulation by histone ubiquitination and deubiquitination. *Genes & development* **17**: 2733-2740

Zhang Y, Dickinson JR, Paul MJ, Halford NG (2003) Molecular cloning of an Arabidopsis homologue of GCN2, a protein kinase involved in co-ordinated response to amino acid starvation. *Planta* **217**: 668-675

Zhong C, Chen C, Kilberg MS (2003) Characterization of the nutrient-sensing response unit in the human asparagine synthetase promoter. *The Biochemical journal* **372**: 603-609

## Résumé

Chez les mammifères, l'environnement est un puissant régulateur de l'expression des gènes. Par exemple, en fonction de l'alimentation, la disponibilité en nutriments, en particulier en acides aminés, est responsable de l'induction de l'expression d'un certain nombre de gènes. Ainsi, des mécanismes moléculaires sont mis en jeu de façon à permettre la détection de ces variations et d'y répondre de façon appropriée. Lorsque l'un des neuf acides aminés essentiels vient à manquer, on observe une augmentation de la transcription de certains gènes. Cette activation de la transcription requiert d'une part l'accumulation du facteur de transcription ATF4 et d'autre part la phosphorylation du facteur de transcription ATF2. La voie ATF4 a été identifiée et relativement bien décrite. En revanche les éléments régulateurs de la voie de signalisation en amont du facteur ATF2 restent inconnus. Le but de ma thèse était donc de déterminer les différents intermédiaires responsables de la phosphorylation d'ATF2 en réponse à une carence en acides aminés.

J'ai ainsi montré qu'une carence en acides aminés provoque la mise en jeu d'un module MAPK composé de MEKK1>MKK7>JNK2 contrôlant la phosphorylation d'ATF2 sur les résidus thréonine 69 et 71. J'ai montré que ce module est régulé en amont par deux GTPases Cdc42+Rac1 et par la protéine Gα12. Enfin, j'ai démontré l'impact de cette nouvelle voie de signalisation sur la transcription AARE-dépendante du gène *ATF3* en réponse à une carence en acides aminés.

Mots clé : Acides aminés, ATF2, MAPK, ATF3

---

## Abstract

In mammals, environment is a powerful regulator of gene expression. For example, according to nutrition, nutrients -and particularly amino acids- availability is responsible for the induction of the expression of numerous genes. Indeed, specific molecular mechanisms are triggered in order to sense and respond adequately to these variations. Whenever one of the nine essential amino acids is missing, the transcription of specific genes is induced. This activation requires the induction of transcription factor ATF4 and the phosphorylation of transcription factor ATF2. The ATF4 pathway has been identified and relatively well described. However, the elements of the pathway upstream of ATF2 phosphorylation were yet unknown.

The aim of my PhD thesis was to identify the different regulatory elements responsible for ATF2 phosphorylation in response to amino acid starvation.

I have shown that amino acid starvation induces the activation of a MAPK module composed of MEKK1>MKK7>JNK2 that controls ATF2 phosphorylation on both threonine 69 and 71. I have shown that this module is regulated by two GTPases Cdc42+Rac1 and by Gα12. Finally, I was able to show that this new pathway is involved in the AARE-dependent transcription of *ATF3* in response to an amino acid starvation.

Keywords : Amino acids, ATF2, MAPK, ATF3